





ZELLBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AM SÜSSWASSERPOLYPEN HYDRA:

SELBST/NICHT-SELBST ERKENNUNG,  
MULTIPOTENZ DER INTERSTITIELLEN STAMMZELLEN  
UND IHRE ROLLE BEI DER GESCHLECHTSBESTIMMUNG.

Dissertation  
der Fakultät für Biologie  
durchgeführt am Zoologischen Institut  
der LMU-München

vorgelegt von  
Thomas C.G. Bosch  
München im Juni 1986

1. Berichterstatter: Prof.C.N.David

2. Berichterstatter: Prof.H.Bohn

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.1986

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

|          |                                                                                                                                                                                                |    |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.       | E I N L E I T U N G.....                                                                                                                                                                       | 5  |
| 2.       | M A T E R I A L   U N D   M E T H O D E N                                                                                                                                                      |    |
| 2.1.     | Material.....                                                                                                                                                                                  | 10 |
| 2.2.     | Kulturbedingungen.....                                                                                                                                                                         | 11 |
| 2.3.     | Zellzahl pro Polyp.....                                                                                                                                                                        | 11 |
| 2.4.     | Bestimmung der Zellzykluslänge.....                                                                                                                                                            | 11 |
| 2.5.     | Histochemische Methoden.....                                                                                                                                                                   | 12 |
| 2.6.     | Transplantationstechnik.....                                                                                                                                                                   | 13 |
| 2.7.     | Nematocysten Analyse.....                                                                                                                                                                      | 13 |
| 2.8.     | Untersuchung der Beweglichkeit der Spermien.....                                                                                                                                               | 13 |
| 2.9.     | Induktion von <u>H.magnipapillata</u> zur<br>Gametendifferenzierung.....                                                                                                                       | 14 |
| 2.10.    | Dissoziation und Reaggregation von Hydra-Gewebe.....                                                                                                                                           | 14 |
| 2.11.    | Häufig verwendete Fachausdrücke.....                                                                                                                                                           | 16 |
| 3.       | E R G E B N I S S E   U N D   D I S K U S S I O N                                                                                                                                              |    |
| 3.1.     | K L O N I E R U N G   V O N   S T A M M Z E L L E N   I N   X E N O P L A S T I S C H E N<br>T R A N S P L A N T A T E N : Entdeckung von<br>Histokompatibilitätsreaktionen bei <u>Hydra</u> . |    |
| 3.1.1.   | E I N F Ü H R U N G.....                                                                                                                                                                       | 19 |
| 3.1.2.   | E R G E B N I S S E                                                                                                                                                                            |    |
| 3.1.2.1. | Stabilität von xenoplastischen Transplantaten.....                                                                                                                                             | 19 |
| 3.1.2.2. | Zellzykluslänge während Parabiose.....                                                                                                                                                         | 21 |
| 3.1.2.3. | Schicksal der interstitiellen Zellen in<br>xenoplastischen Transplantaten.....                                                                                                                 | 22 |
| 3.1.2.4. | Rolle der Phagozytose bei der<br>Verdrängungsreaktion .....                                                                                                                                    | 30 |
| 3.1.2.5. | <u>Hydra</u> erkennt und phagozytiert<br>fremde <u>Hydra</u> -Zellen.....                                                                                                                      | 30 |

|          |                                                                                                                                        |    |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.2.6. | Gibt es eine Art immunologische Gedächtnisreaktion?.....                                                                               | 35 |
| 3.1.3.   | DISKUSSION DER XENOPLASTISCHEN TRANSPLANTATE                                                                                           |    |
| 3.1.3.1. | "Selbst/nicht-selbst"-Erkennung und die Elimination von fremden Zellen.....                                                            | 37 |
| 3.1.3.2. | Ältere Arbeiten zur Kompatibilität von xenoplastischen Transplantaten.....                                                             | 38 |
| 3.1.3.3. | Epithelzellen als Effektorzellen des Immunsystems.....                                                                                 | 40 |
| 3.1.3.4. | Mögliche Bedeutung der "selbst/nicht-selbst"-Erkennung bei <u>Hydra</u> .....                                                          | 40 |
| 3.2.     | KLONIERUNG VON STAMMZELLEN IM REAGGREGATIONSVERSUCH: Nachweis der Multipotenz bezüglich Soma/Keimbahn.                                 |    |
| 3.2.1.   | EINFÜHRUNG.....                                                                                                                        | 42 |
| 3.2.2.   | ERGEBNISSE                                                                                                                             |    |
| 3.2.2.1. | Herstellung von Stammzell-Klonen.....                                                                                                  | 43 |
| 3.2.2.2. | Analyse der Stammzell-Klone.....                                                                                                       | 45 |
| 3.2.2.3. | Wachstumsbedingungen der klonierten Stammzellen....                                                                                    | 48 |
| 3.2.2.4. | Räumliche Anordnung der Stammzell-Klone im Aggregat.....                                                                               | 49 |
| 3.2.2.5. | Zellzusammensetzung der Aggregate.....                                                                                                 | 52 |
| 3.2.2.6. | Gametendifferenzierung in Stammzell-Klonen.....                                                                                        | 56 |
| 3.2.3.   | DISKUSSION DER KLONIERUNGSEXPERIMENTE                                                                                                  |    |
| 3.2.3.1. | Beweis der Multipotenz der Stammzellen.....                                                                                            | 58 |
| 3.2.3.2. | Keine Hinweise für Stammzellen mit Keimbahn-beschränkter Differenzierungskapazität....                                                 | 61 |
| 3.2.3.3. | Implikationen einer multipotenten Stammzelle bei Coelenteraten.....                                                                    | 63 |
| 3.3.     | REKLONIERUNG VON STAMMZELLEN AUS MÄNNLICHEN UND WEIBLICHEN KLONE: Die zelluläre Grundlage der Geschlechtsbestimmung bei <u>Hydra</u> . |    |
| 3.3.1.   | EINFÜHRUNG.....                                                                                                                        | 65 |

|          |                                                                                                                                                                  |    |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.2.   | ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....                                                                                                                                   | 66 |
| 3.3.3.1. | "Sex Switch" der Stammzellen.....                                                                                                                                | 68 |
| 3.3.3.2. | Suppression der weiblichen Differenzierung<br>durch männliche Keimzellen.....                                                                                    | 69 |
| 3.3.3.3. | Geschlechtsbestimmung und Geschlechtsumkehr<br>bei <u>Hydra</u> Polypen und der Zusammenhang zur<br>Anwesenheit von männlichen und weiblichen<br>Keimzellen..... | 70 |
| 4.       | ZUSAMMENFASSUNG.....                                                                                                                                             | 80 |
| 5.       | LITERATUR.....                                                                                                                                                   | 81 |
| 6.       | ANHANG.....                                                                                                                                                      | 91 |



## 1. EINLEITUNG

Vielzellige Organismen können als ein komplexes Muster verschieden differenzierter Zellen definiert werden. Das Muster entsteht, indem aus einem befruchteten Ei im Laufe der Ontogenese verschiedene Zelltypen hervorgehen und diese Zellen im Organismus eine bestimmte Lage einnehmen. Zum Studium beider Vorgänge, der zellulären Differenzierung und der Positionsinformation und Musterbildung, eignet sich der kleine (etwa einen halben Zentimeter lange) im Süßwasser lebende Polyp Hydra.

Hydra besteht aus einigen wenigen Zelltypen und hat eine einfache dreidimensionale Struktur. Am Körper läßt sich eine Kopfregion, eine Gastralregion und eine mit der Fußscheibe endende Fußregion unterscheiden. Adulte Polypen setzen sich aus 120000-200000 Zellen zusammen, die den Gastralraum in 2 Schichten, Ektoderm und Entoderm, umkleiden. Der Gastralraum steht am anterioren Ende durch eine Mundöffnung mit der Außenwelt in Verbindung. Die Mundöffnung ist umgeben von 5-7 Tentakeln, die zum Erfassen der Beute dienen. Am gegenüberliegenden Ende befindet sich die Fußscheibe. Die Zellen der Fußscheibe scheiden ein klebriges Sekret aus, mit dessen Hilfe die Polypen sich am Substrat festheften.

Das Strukturelement im Hydra-Gewebe bilden die in beiden Gewebeschichten vorkommenden Epithelzellen. Zwischen den entodermalen Epithelzellen sind Schleim- und Drüsenzellen eingelagert. Zwischen den ektodermalen Epithelmuskelzellen befinden sich interstitielle Zellen und deren Abkömmlinge.

Die interstitiellen Zellen (abgekürzt IZ) können zu Nervenzellen, 4 verschiedenen Nematocytentypen und Drüsenzellen differenzieren. Dieses IZ-System macht etwa 70-80% der Gesamtzellen eines Polypen aus. In geschlechtsreifen Tieren entstehen auch die Gameten aus ihnen. Ähnlich wie bestimmte Zelltypen höherer Organismen sind Nervenzellen und Nematocyten von Hydra nicht mehr in der Lage, zu proliferieren. Diese

Zellen entstehen durch schrittweise Spezialisierung aus Stammzellen, d.h. Vorläuferzellen, die sowohl zur Proliferation ("self-renewal") fähig sind wie auch zu verschiedenen Zelltypen differenzieren können. Bei jedem Spezialisierungsschritt muß die Zelle zwischen einer Vermehrung des bestehenden Zelltyps und einer weiteren Spezialisierung entlang eines bestimmten Differenzierungsweges entscheiden. Das IZ-System von Hydra stellt ein einfaches Modellsystem dar, an dem seit einigen Jahren diese elementaren Prozesse intensiv studiert werden (Gierer, 1974; Bode und David, 1978; David, 1982). Die Differenzierung zu Nematocyten und Nervenzellen aus der IZ-Population erfolgt ständig. Nervenzellen entstehen aus IZ in etwa einem Tag, während die Bildung von Nematocyten einige Tage in Anspruch nimmt (David und Gierer, 1974). Die Größe der IZ-Population wird durch Proliferation erhalten. Da Nervenzellen vornehmlich im Kopfbereich, Nematocyten aber in der Gastralregion ausdifferenzieren, wird angenommen, daß Positionssignale die Spezialisierung (Determination) der Stammzellen beeinflussen. Es gibt Hinweise, daß ein nieder-molekulares Neuropeptid ("Kopfaktivator") an der Determination der Stammzellen zu Nervenzellen beteiligt ist (Holstein et al., 1986).

Die Fortpflanzung von Hydra geschieht vornehmlich ungeschlechtlich, indem zwischen Gastral- und Fußregion durch Ausstülpung aller Schichten der Körperwand eine oder mehrere Knospen ausgebildet werden. Hydren leben als Einzelpolypen und stoßen ihre Knospen regelmäßig ab. Gelegentlich kommt es zu Phasen geschlechtlicher Fortpflanzung. Bei der geschlechtlichen Fortpflanzung differenzieren die IZ zu Spermatogonien und Oogonien (z.B. Downing, 1905 und 1909; Brien und Reniers-Decoen, 1951; Tardent, 1985). Die Gametendifferenzierung wurde morphologisch bei einer Reihe verschiedener Hydra Arten beschrieben (Zihler, 1972). Eine quantitative Analyse der Spermatogenese (Munck und David, 1985) unterstützt die Annahme, daß auch die Spermiendifferenzierung von Positionssignalen abhängt. Die Gonaden befinden sich in der Gastralregion und bestehen lediglich aus lokalen Anhäufungen

von IZ. In männlichen Polypen differenzieren die IZ der "Hodenanlagen" zu einer großen Zahl von Spermatozoen, während in weiblichen Polypen pro "Eianlage" ein einziges, etwa 500 µm großes Ei hervorgeht. Sekundäre Geschlechtsmerkmale fehlen ebenso wie Follikelzellen und Ausführungsgänge für die Geschlechtszellen. Die aus dem Hoden entlassenen Spermatozoen können die frei am Rumpf der Weibchen klebenden Eier erreichen und besamen.

An geschlechtlichen Hydrozoen beobachtete vor etwa hundert Jahren August Weismann, daß nur bestimmte Gruppen von Zellen zu Gameten ausdifferenzieren können (1880a; 1880b; 1883; 1884). A. Weismann, der daraufhin in seiner Schrift "Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung" (1892) das Konzept der vom Soma abgetrennten Keimbahn begründete, betonte, daß gerade die Coelenteraten - und im besonderen die Cnidaria - in geradezu beispielhafter Art die Existenz einer Keimbahn demonstrieren. Bald wurde klar, daß bei vielen Organismen eine deutliche Unterscheidung zwischen somatischen Zellen (Körperzellen mit Ausnahme der Keimzellen) und Keimbahnzellen getroffen werden kann. Die Zellen der Keimbahn lassen sich unabhängig von den Teilungen der Körperzellen in einer gesonderten Stammlinie unmittelbar bis zur Entstehung der Keimzellen für die nächste Generation verfolgen (nach Seidel, 1972). Das Konzept einer ununterbrochenen Keimbahn wurde daher als ein allgemeines Konzept der tierischen Entwicklung angenommen (zur Übersicht siehe Nieuwkopp und Sutasurya, 1984).

Doch, treffen diese Schlußfolgerungen auch für so einfache Metazoen wie die Coelenteraten zu? Hat A. Weismann seine Keimbahn-Theorie nicht gerade auf der Gruppe von Invertebraten aufgebaut, bei denen auf Keimbahn-Differenzierung beschränkte Zellen am unwahrscheinlichsten anzutreffen sind? In keiner zur asexuellen Proliferation, und damit zu klonalem Wachstum fähigen Invertebraten-Gruppe konnte bislang jedenfalls die Abgrenzung einer Gruppe von Keimbahnzellen beobachtet werden (Buss, 1983). Ausgehend von dieser Beobachtung wird angenommen, daß asexuelle Proliferation durch Knospung nur möglich ist bei

Anwesenheit einer aktiv sich teilenden, multipotenten Stammzellpopulation, die sowohl zu somatischer wie auch zu Keimbahn-Differenzierung in der Lage ist (Buss und Green, 1986). In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnte bislang bei Coelenteraten die Existenz einer gesonderten Keimbahn nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Experimentelle Befunde der jüngsten Zeit nun lassen die Existenz einer Keimbahn bei Hydra als durchaus möglich erscheinen. Littlefield (1984) gelang es mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen alle Zellen der Spermatogenese von Hydra oligactis zu zeigen, daß in asexuellen Tieren eine kleine Zahl von IZ existiert, an die der Antikörper bindet. Dies könnten Keimbahnstammzellen sein. Eine andere Möglichkeit aber wäre, daß es sich bei der beobachteten Subpopulation um Spermatogenese-Vorstufen handelt, die in asexuellen Tieren vorkommen.

Die Frage, die in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden sollte, lautete daher: Entstehen bei Hydra Keimbahn- und Somazellen aus einer multipotenten Stammzell-Population oder gibt es innerhalb der IZ Stammzellpopulationen mit eingeschränkter Differenzierungskapazität?

IZ, die zu Gameten differenzieren, lassen sich morphologisch nicht von denen unterscheiden, die zu somatischen Zellen differenzieren (Lentz, 1966). Das Differenzierungspotential einzelner Stammzellen wurde daher untersucht, indem diese Zellen kloniert und die Zellzusammensetzung der Klone analysiert wurde.

Da Hydra Zellen in vitro nicht kultiviert werden können (Trenkner et al., 1973), wurden bislang Stammzellen mittels einer "feeder layer" Methode kloniert. Stammzellen werden dabei in Hydragewebe kultiviert, dessen IZ durch Senfgas-Behandlung eliminiert worden waren (David & Murphy, 1977). Diese Kloniermethode hat den Nachteil, daß das behandelte Wirtsgewebe nach 2-3 Wochen abstirbt. Da diese kurze Zeit für eine

vollständige Gametogenese nicht ausreicht, strebte ich eine in vivo Kloniermethode an, die es erlaubt, Stammzellen langfristig zu kultivieren.

Es gibt zwei Möglichkeiten, Stammzellen von Hydra zu klonieren. Zum einen kann man Stammzellen einer Art im Gewebe einer anderen Art klonieren. Voraussetzung hierfür ist, daß artspezifische Unterschiede der Stammzellprodukte es erlauben, die Zellen beider Arten zu erkennen. Diese Technik, die erfolgreich mit Huhn- und Wachtel-Zellen angewandt wird (Le Douarin, 1980), war bei Hydra unter Verwendung der beiden Arten H. oligactis und H. attenuata möglich. Der Klonierungsversuch schlug fehl, da ich im Laufe dieser Experimente entdeckte, daß Hydra ein "selbst/nicht-selbst" Erkennungssystem besitzt und fremde Zellen elimiert. Die Ergebnisse werden im ersten Abschnitt dieser Arbeit dargestellt.

Die zweite Möglichkeit war, als Wirt eine Mutante zu verwenden, die temperatur-sensitive IZ enthält, und in diesem Gewebe temperatur-resistente Stammzellen zu klonieren. Die Stammzellen des Wirtsgewebes wurden durch Temperatur-Erhöhung eliminiert und anschließend die klonierten, temperatur-resistenten Zellen analysiert. Mit dieser Methode konnte ich Stammzellen klonieren und langfristig kultivieren. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, daß die Stammzellen von Hydra multipotent sind in dem Sinn, daß jede Stammzelle sowohl zu somatischen wie zu Keimbahn-Zellen differenzieren kann. Es konnten keine Hinweise für die Existenz einer Keimbahn im Weismann'schen Sinn gefunden werden. Die Experimente werden im zweiten Abschnitt dieser Arbeit beschrieben.

Da in diesen Klonierungsversuchen überraschenderweise Stammzellen aus männlichen Polypen männliche wie auch weibliche Gameten differenzierten, untersuchte ich im dritten Teil der vorliegenden Arbeit die sexuelle Differenzierungspotenz dieser Stammzellen. Durch Reklonierung dieser Stammzellen stellte ich fest, daß weibliche Stammzellen in ihrer geschlechtlichen Differenzierungsleistung stabil, männliche Stammzellen dagegen

gelegentlich zur Geschlechtsumkehr fähig sind. Auf der Grundlage dieser und der aus der Literatur bekannten Ergebnisse wird schließlich ein Modell zur zellulären Grundlage der Geschlechtsbestimmung bei Hydra vorgestellt.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Material

Für die Untersuchungen wurde ein Stamm von Hydra attenuata, ein Stamm von H. oligactis sowie Wildtyp und mehrere Mutanten von H. magnipapillata verwendet. Hydra attenuata und H. oligactis entstammen ursprünglich den Institutszuchten von Prof. Tardent, Zürich. Der H. attenuata-Stamm wird seit 1968 im Labor von Prof. David kultiviert. Der H. oligactis-Stamm wurde mir 1982 von Prof. Tardent zu Verfügung gestellt. Wildtyp und Mutanten von H. magnipapillata wurde mir von Prof. Sugiyama, Mishima, vor Beginn der Untersuchungen zur Verfügung gestellt; außer dem Wildtyp Stamm ("105") verwendete ich die Mutante "ms-1", deren IZ zu immobilen Spermien differenzieren (Sugiyama und Fujisawa, 1977). Ferner benützte ich die Mutante "sf-1", deren IZ temperatursensitiv sind und bei 24°C eliminiert werden (Marcum et al., 1980). Darüberhinaus fand Mutante "nem-1" Verwendung. Die IZ dieser Mutante differenzieren zu deformierten (bananenförmigen) holotrichen Isorhizen (Sugiyama und Fujisawa, 1977). Von Mutante "ms-1" und "sf-1" wurde vor Beginn der Experimente die Wachstumsrate bestimmt. Für beide Stämme konnte eine Verdopplungszeit der Epithelzellen von 4 Tagen ermittelt werden. Die Verdopplungszeit der IZ entsprach der Verdopplungszeit der Epithelzellpopulation. Die Befunde stimmen mit früher ermittelten Wachstumsraten der beiden Stämme überein (Takano et al., 1980) und zeigen, daß das Gewebe beider Stämme mit gleicher Rate wächst.

Soweit nicht anders angegeben, werden für alle Experimente

Standard-Tiere verwendet. Als Standard-Tier wird ein Polyp definiert, der vor kurzem von einem Elterntier als Knospe abgefallen ist, selbst keine Knospe trägt und einer gut gefütterten Massenkultur entstammt.

## 2.2. Kulturbedingungen

Die Tiere wurden entsprechend der Methode von Lenhoff und Brown (1970) in einem modifizierten Medium ( = "Hydramedium" = deionisiertes Wasser mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM KCl und 1 mM  $\text{NaHCO}_3$ , mit HCl auf pH 7.8 eingestellt) kultiviert. Die Kulturen befanden sich in einem Klimaraum bei  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ , in dem auch alle Experimente durchgeführt wurden. Die Polypen wurden täglich mit frisch geschlüpften Artemia salinas Nauplii gefüttert und 4-6 Stunden später das Medium erneuert.

## 2.3. Zellzahl pro Polyp

Die Anzahl der Zellen pro Polyp wurde nach der Mazerationsmethode von David (1973) bestimmt. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Hydren einschließlich der Tentakel mazeriert. Pro Zeitwert wurden 5-10 Hydren mazeriert. Um die Zahl der Stammzellen zu bestimmen, wurden die großen, einzeln oder paarweise vorkommenden IZ gezählt. David und Murphy (1977) konnten zeigen, daß diese Zellpopulation die Stammzellen enthält.

## 2.4. Bestimmung der Zellzykluslänge

Die Länge des Epithelzellzyklus wurde durch Dauermarkierung mit  $^3\text{H}$ -Thymidin bestimmt (Campbell und David, 1972). Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidin (spezifische Aktivität 44 Ci/mM; Amersham Buchler, Braunschweig) wurde in einer Konzentration von 50 - 100  $\mu\text{Ci/ml}$  mit einer Polyäthylenspritze durch die Mundöffnung in den Gastralraum der Polypen injiziert (0.5  $\mu\text{l}$ /Injektion).

Eine Dauermarkierung wurde durch wiederholte Injektionen in Intervallen von je 12 Stunden über 3 Tage hinweg erreicht (David und Campbell, 1972). Zu jedem Zeitwert wurden 5-10 Tiere mazeriert und die Zellsuspension auf gelatinisierte Objektträger aufgetragen. Zur Autoradiographie wurden die Mazerationspräparate mit Kodak-NTB-2-Emulsion beschichtet, 5-10 Tage bei 4°C exponiert und anschließend im Phasenkontrastmikroskop analysiert. Die Länge des Zellzyklus wurde bestimmt, indem die Markierungsindex-Kurve einer theoretischen Kurve für eine exponentiell wachsende Zellpopulation angeglichen wurde. Der Markierungsindex (MI) einer solchen Zellpopulation kann durch  $MI = 2(1 - 2^{-t/T})$  beschrieben werden, wobei t ein bestimmter Zeitpunkt im Zellzyklus der Länge T ist (Bosch und David, 1984). Nach Umformung dieser Gleichung erhält man  $\ln(1 - MI/2) = (-\ln 2/T)(t)$ . Trägt man die experimentellen Daten in dieser Form auf, erhält man eine Gerade mit der Steigung  $-\ln 2/T$ . Die Zellzyklusdauer T wurde schließlich durch lineare Regression bestimmt.

## 2.5. Histochemische Methoden

**FEULGEN-FÄRBUNG:** Um Epithelzellen mit Phagozytose-Vakuolen erkennen und quantifizieren zu können, wurden Mazerationspräparate nach der Feulgen-Methode mit Lichtgrün als Gegenfarbe angefärbt (Romeis, 1968).

**THIO-ESSIGSÄURE-FÄRBUNG:** In der Rumpffregion differenzierende Nematoblasten wurden identifiziert, indem Alkohol fixierte Polypen mit Thio-Essigsäure in Gegenwart von  $PbNO_3$  angefärbt wurden (David und Challoner, 1974).

**TOLUIDIN-BLAU-FÄRBUNG:** Klone von IZ in Aggregaten wurden durch Anfärben Alkohol-fixierter Aggregate mit 0.05% Toluidin-Blau sichtbar gemacht (Diehl und Burnett, 1964; David und Murphy, 1977). IZ können identifiziert werden, da sie sich wesentlich intensiver als das umgebende Epithelgewebe anfärben lassen.

## 2.6. Transplantationstechnik

Transplantate wurden hergestellt, indem Polypen-Hälften auf eine Nylon-Angelschnur aufgefädelt wurden (Rubin und Bode, 1982). Die beiden Hälften wurden mit kleinen Stücken eines Polyäthylenschlauches (Clay Adams, PE10) für etwa eine Stunde in engem Kontakt gehalten. Nach dem Verwachsen der beiden Gewebe-Hälften wurden die Schlauchstücke entfernt und das Transplantat von der Schnur genommen.

## 2.7. Nematocysten-Analyse

Morphologische Kriterien erlauben es, die Nesselkapseln (= Nematocysten) verschiedener Hydra Arten zu unterscheiden (Lee und Campbell, 1979; Campbell, 1983). Um die Nematocysten-Zusammensetzung in den Tentakeln zu studieren, wurden 3-5 Tentakel eines jeden Transplantates entfernt, auf einen Objektträger überführt und leicht unter einem Deckglas gequetscht. Die Nematocysten wurden mit Hilfe eines Interferenz-Mikroskopes analysiert. Von den vier Nematocyten-Typen von Hydra wurden zur quantitativen Analyse insbesondere die Desmonemen (Volventen) und die holotrichen Isorhizen (Glutinanten) herangezogen. Die Länge der Desmonemen wurde mit Hilfe eines Okular-Mikrometers bestimmt.

## 2.8. Untersuchung der Beweglichkeit der Spermien

Zur Untersuchung der Spermienbeweglichkeit wurden Polypen, die eine Reihe von Hoden entwickelt hatten, auf einen Objektträger überführt, unter einem Deckglas leicht gequetscht und die Spermien im Hoden mit Hilfe eines Phasenkontrast- oder Interferenzmikroskopes untersucht.

## 2.9. Induktion der Gametendifferenzierung bei H.magnipapillata

Die Gametendifferenzierung wurde im wesentlichen wie von Sugiyama und Fujisawa (1977) und Sugiyama und Sugimoto (1985) beschrieben durchgeführt. Zur Induktion der Gametogenese in Massenkulturen wurden die Tiere täglich mit einer geringen Zahl von Salinenkrebssen (1-2 Krebse/Polyp) gefüttert. Das Kulturmedium wurde erst ausgetauscht, wenn es trübe wurde. Um einzeln gehaltene Polypen zur Gametendifferenzierung zu bringen, wurde jeweils ein adultes Tier (= Tier, das mindestens eine Knospe trug) in einer 35mm Plastik-Petrischale gehalten und täglich mit 1-3 Salinenkrebssen gefüttert. Das Kulturmedium wurde erst ausgetauscht, wenn es trübe wurde (etwa einmal pro Woche). Jeder Polyp wurde täglich auf die Bildung von Gonaden untersucht.

Mit diesem Verfahren konnten die meisten in Massenkultur gehaltenen Polypen des Spenderstammes ms-1 in etwa 2-3 Wochen zur Gametenbildung induziert werden. Darüberhinaus konnten auch annähernd alle Aggregate aus ms-1 Gewebe, die nach der unten beschriebenen Klonierungsmethode (Dissoziation, Reaggregation und Langzeitkultur bei 24°C) hergestellt wurden, zur Gametenbildung induziert werden.

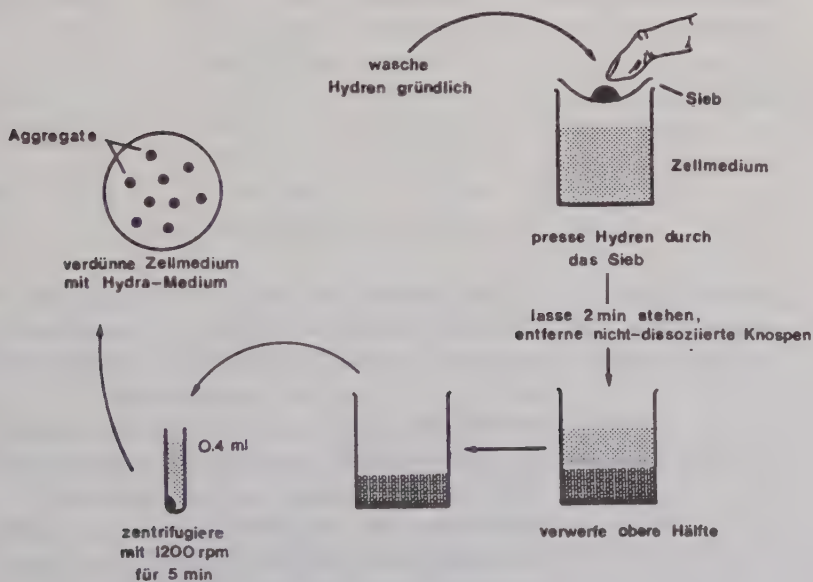
Der sexuelle Phänotyp der Polypen der ms-1 Kultur wie auch der der Reaggregate war männlich. In Massenkulturen von ms-1 konnte jedoch vereinzelt das Auftreten von weiblichen Polypen beobachtet werden (siehe 3.3.2.3.). Der Wirt-Stamm sf-1 trat unter den beschriebenen Kulturbedingungen niemals in Sexualphase auf.

## 2.10. Dissoziation und Reaggregation von H.magnipapillata Gewebe

Die Dissoziationslösung enthielt 3.6 mM KCl, 6 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 6 mM Na-citrat, 6 mM Na-pyruvat, 6 mM Glucose, 12.5 mM TES-Puffer und war auf pH 6.9 eingestellt (Gierer et al., 1972). Der Lösung wurden die Antibiotika Rifampicin (50mg/ml),

Streptomycin (100 mg/ml) und Kanamycin (50 mg/l) zugesetzt. Alle zur Dissoziation benötigten Glaswaren wurden vor Gebrauch sorgfältig mit deionisiertem Wasser gespült. Der Arbeitsplatz wurde mit Alkohol (70%) gereinigt.

In Klonierexperimenten wurde das Spendergewebe nach der von Gierer et al. (1972) beschriebenen "Pipettier"-Methode dissoziiert. Zur Dissoziation des Wirtsgewebes modifizierte ich eine Technik, die in der Zellbiologie bei der Herstellung von Primärkulturen Anwendung findet ("Siebtechnik", z.B. Gebicke-Härter et al., 1984). Das Vorgehen ist schematisch in Fig.1 dargestellt. Etwa 500 Hydren wurden einer gut gefütterten Massenkultur entnommen und gründlich in Hydramedium gewaschen. Anschließend wurden die Tiere in 120 ml Dissoziationsmedium gegeben und auf ein rostfreies Stahlsieb von 1mm Porengröße



**Fig.1.** Schematische Darstellung der Dissoziation und Reaggregation von H. magnipapillata Gewebe ("Siebtechnik").

( = handelsübliches Teesieb) aufgetragen. Nun wurde das Hydra-Gewebe mit leichten Drehbewegungen des Fingers durch die Siebporen gerieben. Die aus dem Gewebeverband gerissenen Zellen wurden mit Dissoziationsmedium vom Sieb in ein Becherglas gespült. Der Vorgang wurde wiederholt, bis das meiste Gewebe dissoziiert war. Die erhaltene Zellsuspension wurde für wenige Minuten stehengelassen. Dann wurde das obere Drittel der Suspension mit einer Pipette abgesaugt und verworfen; damit werden die meisten Zellbruchstücke eliminiert. Sich am Boden des Becherglases abgesetzte Knospen und große Gewebestückchen wurden mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen.

Um Aggregate herzustellen, wurde die Zellsuspension in 0.4ml Polyäthylen-Reaktionsgefäße (Greiner, Nürtingen) gegeben und für 5 Minuten bei 1200 g zentrifugiert. Die erhaltenen Zellklumpen wurden in Petrischalen mit Dissoziationslösung überführt. Zur weiteren Kultur wurde die Dissoziationslösung (DL) schrittweise mit Hydramedium (HM) verdünnt. Als geeignete Verdünnungsschritte haben sich erwiesen: 24 Std = 3 DL + 1 HM, 33 Std = 2 DL + 1 HM, 48 Std = 1 DL + 1 HM, 57 Std = 1 DL + 2 HM, 72 Std = HM.

## 2.11. Häufig verwendete Fachausdrücke

|                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Interstitielle Zellen (IZ)</p> | <p>In den intraepithelialen Hohlräumen des Ektoderms liegende, kleine, tropfenförmige Zellen, die einzeln, paarweise oder in Nestern von 4, 8, und 16 Zellen vorkommen. Größe und Morphologie lassen zwei Gruppen von IZ unterscheiden: große IZ (Durchmesser 15-20µm) mit großem Kern, prominentem Nukleolus und granulärem Cytoplasma und kleine (6-10µm) IZ mit großem, stark granulärem Kern ohne prominentem Nukleolus und stark reduziertem Cytoplasma.</p> |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                       |                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Klon                  | (1) Population von Zellen, die durch Mitosen von einer einzigen Zelle abstammen. (2) Alle Individuen, die asexuell von einem einzelnen Individuum abstammen.                                                                           |
| CFU<br>(Stammzelle)   | Clone Forming Unit = Stammzelle = Zelle, die sowohl proliferieren wie auch differenzierte Zellen entstehen lassen kann. Stammzellen von <u>Hydra</u> finden sich in der Population der einzeln oder paarweise vorkommenden, großen IZ. |
| Nematocyte            | Nesselzelle,                                                                                                                                                                                                                           |
| Nematocyste           | Kapsel einer Nesselzelle,                                                                                                                                                                                                              |
| Nematoblast           | Vorläuferzelle einer Nesselzelle.                                                                                                                                                                                                      |
| Zelllinie             | Steht für die Nachkommenschaft einer bestimmten Zellpopulation.                                                                                                                                                                        |
| Parabiose             | Experimentelle Vereinigung von Gewebe zweier Individuen.                                                                                                                                                                               |
| Homoplastisch         | Transplantat aus dem Gewebe eines Individuums.                                                                                                                                                                                         |
| Heteroplastisch       | Transplantat aus Gewebe verschiedener Individuen derselben Art.                                                                                                                                                                        |
| Xenoplastisch         | Transplantat aus Gewebe von Individuen verschiedener Arten.                                                                                                                                                                            |
| Gonochoristisch       | Getrenntgeschlechtlich.                                                                                                                                                                                                                |
| Heterosexuell         | Transplantat aus Gewebe beider Geschlechter.                                                                                                                                                                                           |
| Simultan-Hermaphrodit | In einem Individuum werden Gameten beider Geschlechter gleichzeitig gebildet.                                                                                                                                                          |
| Keimbahn              | Zellen, die sich unabhängig von den Teilungen der Körperzellen in einer gesonderten Stammlinie unmittelbar bis zur Entstehung der Keimzellen für die nächste Generation verfolgen lassen (nach Seidel,                                 |

1972).

|                                 |                                                                                                                                                            |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Soma                            | Alle Körperzellen eines Individuums mit Ausnahme der Keimzellen.                                                                                           |
| "switch"<br>und<br>"sex switch" | Wechsel; der Molekularbiologie entlehnter Begriff (z.B. Saier und Jacobsen, 1984), der bei <u>Hydra</u> den Geschlechtswechsel der Stammzellen beschreibt. |
| "non-feeder"                    | Von Sugiyama und Fuijsawa (1977) eingeführte Bezeichnung von Polypen, die die Fähigkeit zur selbständigen Nahrungsaufnahme verloren haben.                 |
| "self-feeder"                   | Polypen, die zur selbständigen Nahrungsaufnahme fähig sind.                                                                                                |

### 3. E R G E B N I S S E

#### 3.1. KLONIERUNG VON STAMMZELLEN IN XENOPLASTISCHEN TRANSPLANTATEN : Entdeckung von Histokompatibilitätsreaktionen bei Hydra

##### 3.1.1. EINFÜHRUNG

In Anlehnung an die erfolgreiche Transplantation von embryonalen Wachtelzellen in Hühnerembryonen (Le Douarin, 1980) stellte ich aus verschiedenen Hydra-Arten xenoplastische Transplantate her. Stammzellen einer Art sollten in das Gewebe einer anderen Art einwandern, dort proliferieren und differenzieren. Artspezifische Unterschiede in den Differenzierungsprodukten sollten eine Analyse des Differenzierungspotentials einzelner Stammzellen ermöglichen.

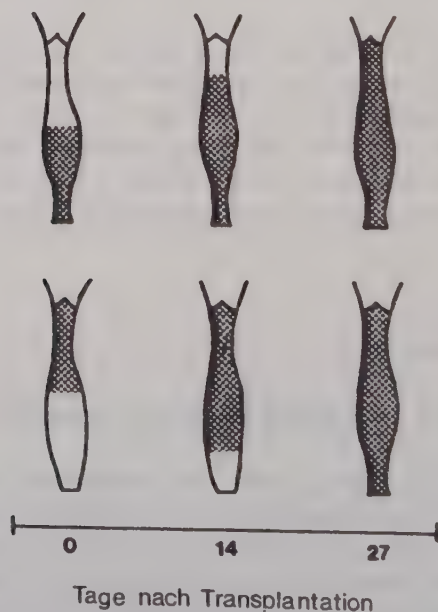
Diese Experimente führten zu dem Ergebnis, daß IZ nicht in der Lage sind, für einen längeren Zeitraum im Gewebe einer anderen Art zu proliferieren. Als Ursache hierfür konnte die Existenz von Histoinkompatibilitätsreaktionen nachgewiesen werden. Hydra unterscheidet "selbst" und "nicht-selbst"; Zellen fremder Arten werden von Epithelzellen per Phagozytose eliminiert (Bosch & David, 1986a).

##### 3.1.2. ERGEBNISSE

###### 3.1.2.1. Stabilität von xenoplastischen Transplantaten

Der Transplantationserfolg, d.h. ein dauerhaftes Verwachsen der beiden Gewebehälften, hängt von der verwendeten Art-Kombination ab und sinkt mit abnehmendem Verwandtschaftsgrad der verwendeten Arten (Bibb und Campbell, 1973). In Übereinstimmung mit Berichten aus der Literatur (Campbell und Bibb, 1970) zeigten eigene Transplantationsversuche, daß die meisten xenoplastischen Kombinationen nicht stabil sind; in solchen Transplantaten kam es zu keinem Dauerhaften Verwachsen der Gewebehälften und über kurz oder lang stießen sich die beiden

Gewebeteile ab. Eine Kombination jedoch, H.attenuata und H.oligactis, scheint Parabiose zu tolerieren. Um zu überprüfen, ob bei Verwendung dieser beiden Arten stabile xenoplastische Transplantate hergestellt werden können, wurden distale Hälften von H.oligactis auf proximale Hälften von H.attenuata gesetzt und umgekehrt. Beide Arten sind morphologisch voneinander unterscheidbar, da die entodermalen Epithelzellen beider Arten die Carotenoide der Futterkrebse unterschiedlich verarbeiten; das Gewebe von H.attenuata ist rosa-orange, das von H.oligactis gelb-orange (Wanek und Campbell, 1982). Längstens 24 Stunden nach Transplantation waren in allen 455 H.attenuata/H.oligactis



**Fig.2.** Schemazeichnung, die die Gewebeverdrängung durch H.oligactis in H.attenuata/H.oligactis Transplantaten darstellt. H.attenuata (hell), H.oligactis (punktiert).

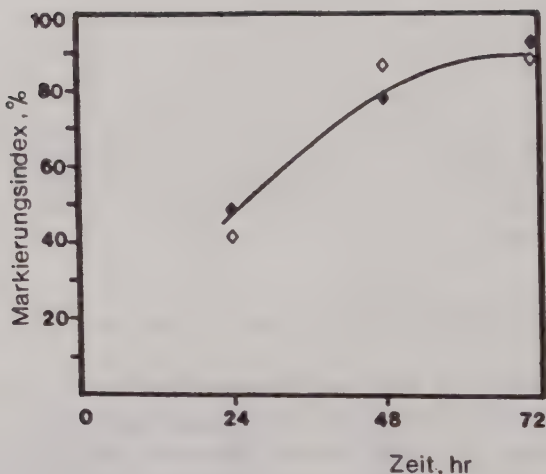
(= att/oli) Transplantaten die beiden Gewebehälften nahtlos verwachsen. Die unterschiedliche Pigmentierung erlaubte es, die Lage der Verwachsungsnaht täglich zu protokollieren.

Bei der langfristigen Kultivierung dieser xenoplastischen Transplantate konnte nun in allen Fällen eine kontinuierliche Verdrängung von H.attenuata Gewebe beobachtet werden. Eine vollständige Verdrängung war nach einigen Wochen erfolgt. Die Verdrängung konnte sowohl in Transplantaten mit H.attenuata in apikaler als auch in basaler Position beobachtet werden (Fig.2).

### 3.1.2.2. Zellzyklus-Länge während Parabiose

Um zu erfahren, ob die Verdrängungsreaktion auf einer verlangsamten Wachstumsrate von H.attenuata beruht, bestimmte ich durch ein Dauermarkierungsexperiment mit  $^3\text{H}$ -Thymin den Epithelzellzyklus beider Arten während der Parabiose. Die xenoplastischen Transplantate wurden für 7 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Transplantate "kontinuierlich", d.h. über 72 Stunden in 12-stündigen Intervallen, mit  $^3\text{H}$ -Thymin markiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Transplantate an der Verwachsungsnaht getrennt und, nach Mazeration und Autoradiographie, der Markierungsindex der Epithelzellen in jeder Hälfte bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, daß etwa 90% der Epithelzellen beider Parabiose-Partner nach 3 Tagen markiert sind (Fig.3.). Die Markierungskinetik erlaubt es, für die Epithelzellen beider Hälften eine Zellzyklus-Länge von 3.8 Tagen zu berechnen (siehe MATERIAL UND METHODEN). Darüberhinaus konnte festgestellt werden, daß die 12-Population beider Hälften nach dieser Markierungsprozedur vollständig markiert ist.

Zusammenfassend zeigen die Markierungsexperimente, daß die beobachtete Verdrängungsreaktion nicht auf unterschiedlichen Zellzykluslängen der beiden Arten während der Parabiose beruht.



**Fig.3.**  $^3\text{H}$ -Thymidin-Markierung der Epithelzellen in att/oli Transplantaten. Die xenoplastischen Transplantate wurden für 7 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Transplantate für 3 Tage mit  $^3\text{H}$ -Thymidin "dauermarkiert" (siehe MATERIAL UND METHODEN). An jedem Tag wurden 10 Transplantate an der Grenze zwischen den beiden Partnern getrennt und der Markierungsindex in jedem Gewebeteil bestimmt. (◆) H.attenuata, (◇) H.oliqactis.

### 3.1.2.3. Schicksal der interstitiellen Zellen in xenoplastischen Transplantaten

Da die beobachtete Verdrängung der Epithelzellen (Fig.2) nicht ausschließt, daß IZ zwischen beiden Arten ausgetauscht werden, untersuchte ich nun das Schicksal der Zellen der IZ-Linie in xenoplastischen Transplantaten und studierte dazu die Nematocysten-Zusammensetzung in den Tentakeln der

Transplantate. Desmonemen von H. oligactis und H. attenuata unterscheiden sich signifikant in der Länge ihrer Kapseln (Fig.4; Lee und Campbell, 1979). Aufgrund der unterschiedlichen

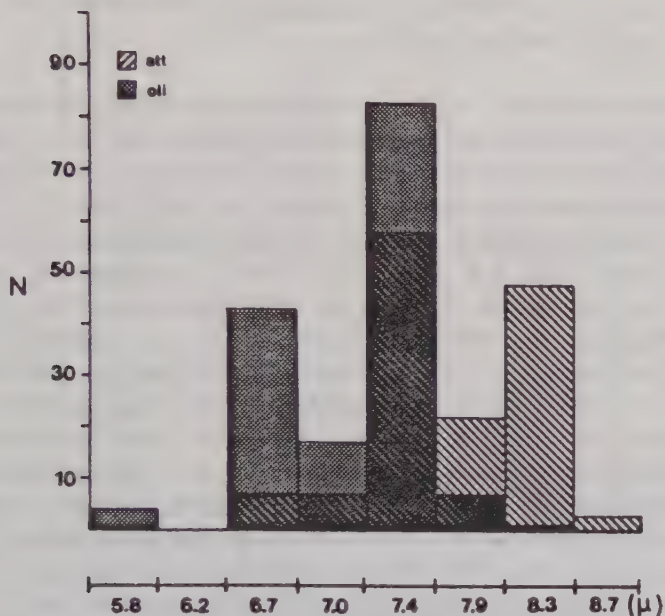


Fig.4. Größe der Desmonemen von H. oligactis und H. attenuata.

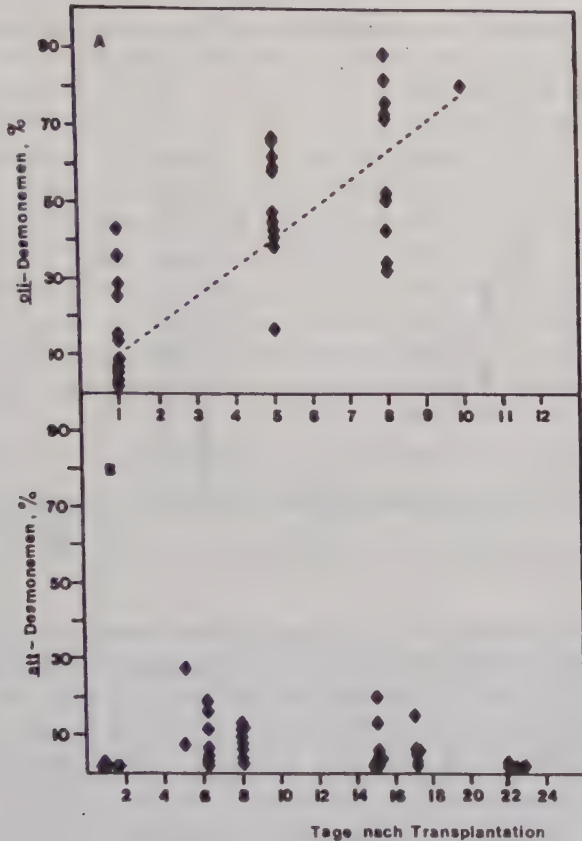
Bei quantitativen Tentakelanalysen (siehe MATERIAL UND METHODEN) wurden nur Desmonemen der Größenklasse  $\geq 8.3 \mu\text{m}$  und  $\leq 6.7 \mu\text{m}$  berücksichtigt.

Größe war es möglich, das Schicksal dieser Zellpopulation in den Tentakeln der Heterografts zu studieren. Die Ergebnisse in Fig.5. zeigen, daß H. oligactis-Desmonemen H. attenuata-Desmonemen in einem Zeitraum ersetzen, in dem in etwa auch die allgemeine Gewebeverdrängung (Fig.2.) beobachtet werden kann. Nach ungefähr 10 Tagen sind etwa 80% der Desmonemen in den Tentakeln von att/oli Transplantaten vom H. oligactis-Typ. In

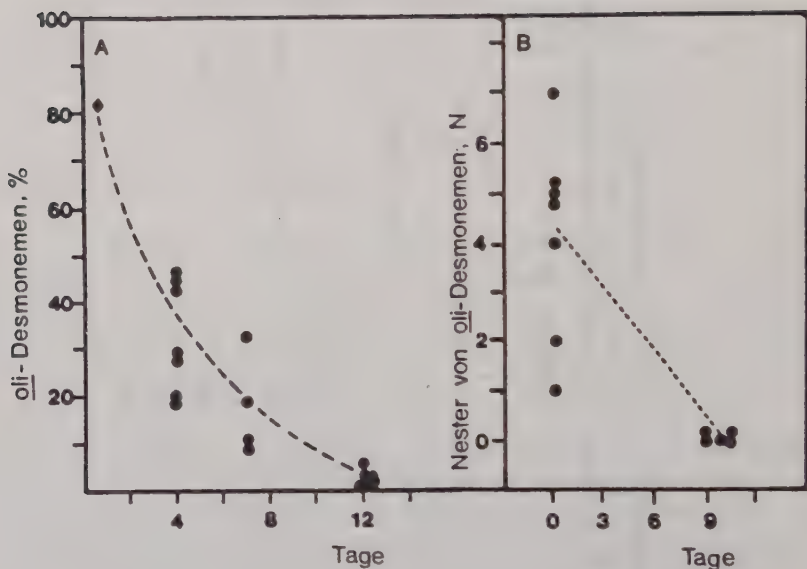
oli/att Transplantaten dagegen, deren Tentakel vom H.oliqactis-Typ sind, konnten selbst zu frühen Zeitpunkten nach Transplantation, wenn die Hälfte des Transplantates aus H.attenuata Gewebe besteht, nur wenige H.attenuata Desmonemen gefunden werden (Fig.5.B). Dieser Befund weist auf eine effiziente Verdrängung der H.attenuata Desmonemen in H.oliqactis Gewebe hin (siehe 3.1.3.1.).

Um herauszufinden, ob die Verdrängungsreaktion von der ständigen Anwesenheit von H.oliqactis abhängig ist, wurden nun att/oli Transplantate 10 Tage nach Transplantation, wenn die meisten Desmonemen vom H.oliqactis-Typ sind (vgl.Fig.5.A), an der Verwachsungsnaht getrennt und die H.attenuata Hälfte weiter kultiviert. Fig.6.A zeigt, daß jetzt, in Abwesenheit von H.oliqactis Gewebe, H.oliqactis Desmonemen innerhalb von etwa 12 Tagen aus den Tentakeln verschwinden. Das Ergebnis zeigt, daß die beobachtete Verdrängung von H.attenuata Desmonemen (Fig.5A) deutlich von der Anwesenheit von H.oliqactis Gewebe abhängig ist (Fig.6A). Dieser Befund ist angesichts der ausgeprägten Wanderungsfähigkeit der IZ im Hydra-Gewebe (Tardent und Morgenthaler, 1966; Heimfeld und Bode, 1984a) durchaus überraschend. Die Wanderungseigenschaften der IZ lassen erwarten, daß nach einigen Tagen der Parabiose die IZ beider Arten vollkommen durchmischt sind. In der Tat, in Übereinstimmung mit den Befunden von Heimfeld und Bode (1984a) konnten wir in xenoplastischen Transplantaten eine intensive Wanderung der IZ zwischen H.oliqactis- und H.attenuata Gewebe nachweisen. In att/oli Transplantaten, in denen die H.oliqactis Hälfte mit <sup>3</sup>H Thymidin markiert war, waren 17% der IZ in der apikalen H.attenuata Hälfte zwei Tage nach Transplantation markiert. In oli/att Transplantaten, in denen H.attenuata mit <sup>3</sup>H-Thymidin markiert war, waren zwei Tage nach Transplantation 9% der IZ in der apikalen H.oliqactis Hälfte markiert. Das Ausmaß der Wanderung ist daher durchaus ähnlich dem von IZ in heteroplastischen H.attenuata/H.attenuata Transplantaten (Heimfeld und Bode, 1984a).

Da diese Ergebnisse zeigen, daß IZ in artfremdes Gewebe



**Fig.5. A.** Verdrängung von *H.attenuata* Desmonemen in Tentakeln von *att/oli* Transplantaten. Zu jedem Zeitpunkt wurden 2-4 Tentakel analysiert. Nach jeder Analyse wurden alle Tentakel des betreffenden Tieres entfernt, um die Regeneration neuer Tentakel zu erlauben. Die Nematocytenzusammensetzung der Tentakel gibt daher die relative Anzahl der *H.oligactis* bzw. *H.attenuata* Nematocyten wieder, die zwischen zwei Zeitpunkten differenziert wurden. Jeder Wert stellt das Ergebnis der Untersuchung eines einzelnen Individuums dar. **B.** Erscheinen von *H.attenuata* Desmonemen in Tentakeln von *oli/att* Transplantaten (gleiches Vorgehen wie in A).



**Fig.6.** Verdrängung von *H.oligactis* Desmonemen aus *H.attenuata* Gewebe. Jeder Wert stellt die Ergebnisse der Untersuchung eines einzelnen Polypen dar. A. Nach 10 Tagen Parabiose wurden die att/oli Transplantate an der Verwachsungsnaht der beiden Gewebehälften getrennt. Die apikale *H.attenuata* Hälfte wurde weiter kultiviert, und die Tentakel auf die Anwesenheit von *H.oligactis* Desmonemen analysiert. (◆), 10-Tage Wert aus Fig.5A. B. Nach 2 Tagen Parabiose wurden die att/oli Transplantate an der Verwachsungsnaht getrennt und die *H.attenuata* Hälfte weiter kultiviert. Diese Tiere wurden mit Bleinitrat-Thio-Essigsäure (siehe MATERIAL UND METHODEN) am Tag 0 und 8 gefärbt, um Nester von differenzierenden Nematoblasten identifizieren zu können.

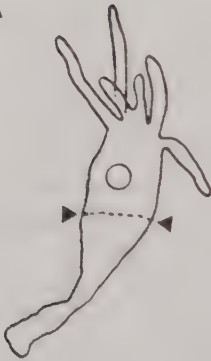
einwandern können, stellte sich nun die Frage, ob IZ im fremden Gewebe auch differenzieren können. Zur Beantwortung dieser Frage untersuchte ich die Differenzierung von IZ zu Nematocyten und wendete eine histochemische Färbemethode an, die spezifisch

Nematocysten-Kapseln von differenzierenden Nematoblasten färbt (David und Challoner, 1974). Die Frage konnte studiert werden, da sich die Desmonemen und holotrichen Isorhizen von H. oligactis morphologisch deutlich von H. attenuata Nematocysten unterscheiden (Lee und Campbell, 1979). Fig.7 zeigt ein Nest von H. oligactis Desmonemen in dem H. attenuata Teil eines xenoplastischen Transplantates. Im Durchschnitt wurden vom Tag 2-3 nach Transplantation an 4 solcher Nester in der H. attenuata Hälfte jedes Transplantates gefunden (Fig.8). Nester von holotrichen Isorhizen vom H. oligactis-Typ wurden ebenfalls beobachtet, obwohl sie weniger häufig waren. Im Gegensatz dazu wurden keine Nematoblasten von H. attenuata Desmonemen in der H. oligactis Hälfte von oli/att Heterografts gefunden (Fig.8).

Die Wanderung von H. oligactis-IZ in H. attenuata Gewebe sowie die Differenzierungsfähigkeit von H. oligactis Nematoblasten in H. attenuata Gewebe legt daher nahe, daß in att/oli Transplantaten eine Durchmischung von H. attenuata- und H. oligactis-IZ erfolgt.

Um die Stabilität einer solchen gemischten Population von IZ zu testen, wurden nun die H. attenuata Teile der Transplantate isoliert, für mehrere Tage kultiviert und schließlich die differenzierenden Nematoblasten gefärbt. Das Ergebnis in Fig.6B zeigt, daß Nester von H. oligactis Desmonemen in isoliertem H. attenuata Gewebe innerhalb von 9 Tagen verschwinden. Da sowohl H. oligactis Nematocysten (Fig.6A) wie auch H. oligactis Nematoblasten (Fig.6B) in isoliertem H. attenuata Gewebe durch H. attenuata Zellen ersetzt werden, wird deutlich, daß gemischte Populationen von H. oligactis- und H. attenuata-IZ nicht stabil sind.

A

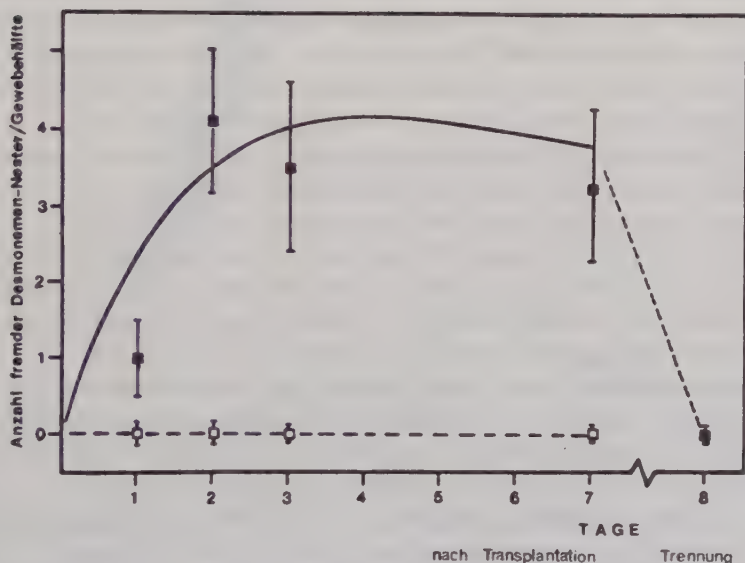


att

att

oli

Fig. 7. Nester von differenzierenden Nematoblasten (Desmonemen) in der H.attenuata Hälfte eines att/oli Transplantates, das mit Thioessigsäure und Bleinitrat angefärbt wurde. A. Camera lucida Zeichnung des xenoplastischen Transplantates. Es ist die Grenze zwischen den beiden Partnern eingezeichnet sowie die Lokalisation des im Detail in B gezeigten Ausschnittes (Kreis). B. Ausschnitt aus der H.attenuata Hälfte eines att/oli Transplantates 3 Tage nach Transplantation. Der Ausschnitt zeigt ein Nest von H.oliqactis Desmonemen und 2 Nester von H.attenuata Desmonemen. X 1500.



**Fig.8.** Anzahl der Nester von differenzierenden Desmonemen in xenoplastischen Transplantaten, die mit Thioessigsäure-Bleinitrat zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation angefärbt wurden. (■) Nester von H.oliqactis in der H.attenuata Hälfte von att/oli Transplantaten. (□) Nester von H.attenuata Desmonemen in der H.oliqactis Hälfte von oli/att Transplantaten. Die Symbole stellen den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) von 5-7 Tieren dar.

#### 3.1.2.4. Rolle der Phagozytose bei der Verdrängungsreaktion

Seit langem ist bekannt, daß Coelenteraten ein aktives Phagozytosesystem besitzen (Metschnikoff, 1905). Neuere Arbeiten an Hydra zeigen, daß unter bestimmten Umständen ektodermale wie entodermale Epithelzellen eine hohe Phagozytoseaktivität entwickeln können (Campbell, 1976; Fujisawa und David, 1984; Bosch und David, 1984; Kobatake und Sugiyama, 1986). Aus diesem Grund untersuchte ich im folgenden, ob in xenoplastischen Transplantaten die Verdrängung einer Art auf der Phagozytose dieser Art durch die andere beruht. Die Phagozytoseaktivität wurde quantifiziert, indem in Feulgen-gefärbten Mazerationspräparaten von xenoplastischen Transplantaten wie auch von heteroplastischen Kontrolltransplantaten sowie von nicht transplantierten Kontrolltieren die Zahl der Epithelzellen ermittelt wurde, die Phagozytosevakuolen enthielten. Fig.9a zeigt eine Epithelzelle, die eine phagozytierte Zelle in einer Vakuole enthält. In xenoplastischen Transplantaten wurden im Bereich der Verwachsungsnaht zwei- bis dreimal mehr Epithelzellen mit Phagozytosevakuolen gefunden als in anderen Körperregionen (Fig.10). Phagozytierende Epithelzellen wurden sowohl im Ektoderm wie im Entoderm gefunden. Heteroplastische Transplantate dagegen enthielten nicht mehr phagozytierende Epithelzellen als nicht-transplantierte Kontrolltiere.

Die leicht erhöhte Phagozytoseaktivität in der basalen Hälfte von att/oli Heterografts scheint auf die Einwanderung von H.attenuata-IZ in H.oliqactis Gewebe und auf eine etwas effektivere Phagozytose von H.attenuata durch H.oliqactis zurückzuführen zu sein (siehe Diskussion).

#### 3.1.2.5. Hydra erkennt und phagozytiert fremde Hydra-Zellen

Die Auswertung der Feulgen-gefärbten Mazerationspräparate zeigte eine erhöhte Phagozytose-Aktivität in xenoplastischen Transplantaten; die Versuche ließen aber nicht erkennen, ob fremde oder eigene Zellen phagozytiert wurden. Um daher zu

untersuchen, ob tatsächlich Zellen der fremden Hydra-Art phagozytiert werden können, wurde nun jeweils ein Partner

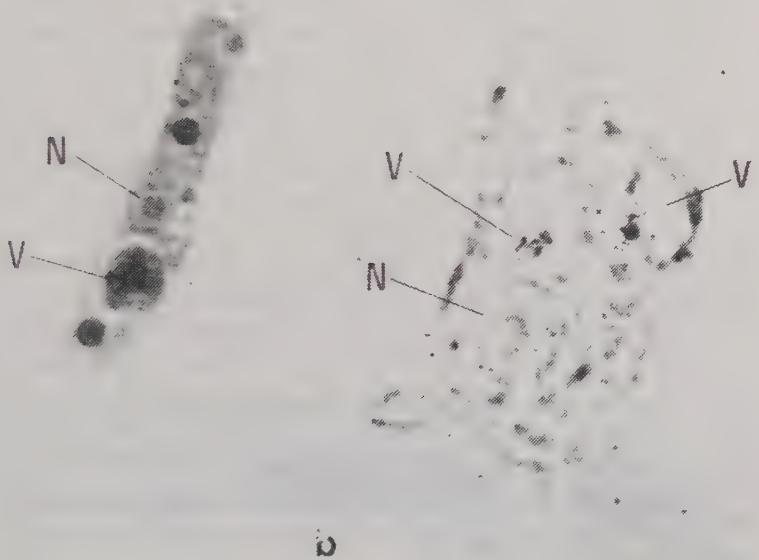
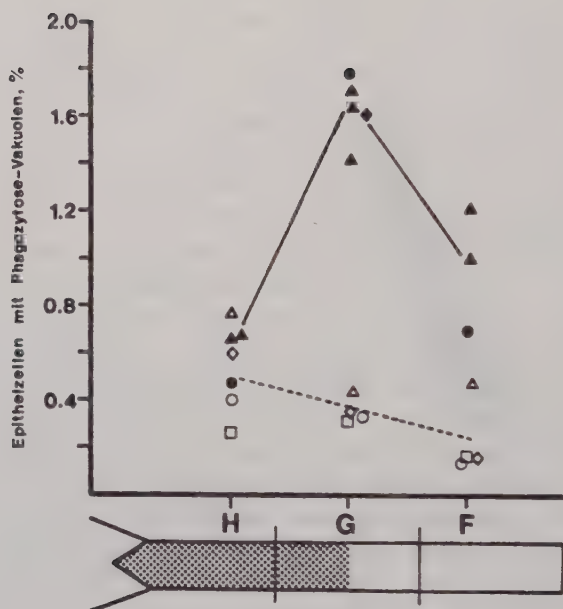


Fig.9.a. Epithelzelle, die eine phagozytierte Zelle enthält.

Die Zellen wurden nach Feulgen mit Lichtgrün als Gegenfarbe (siehe MATERIAL UND METHODEN) gefärbt (V = Vakuole, N = Nukleus), X 1370. Derartige Phagozytose-Vakuolen wurden sowohl in ektodermalen wie in entodermalen Epithelzellen der Verwachsungszone gefunden und wurden ausführlich in einer früheren Arbeit charakterisiert (Bosch und David, 1984). b. Autoradiogramm einer Epithelzelle, die eine <sup>3</sup>H-Thymidin-markierte Vakuole enthält (V = Vakuole, N = Nukleus), X 2370. Die Zelle stammt aus Gewebe der Verwachsungszone eines att/oli Transplantates, in dem der H.attenuata Partner mit <sup>3</sup>H-Thymidin markiert war.

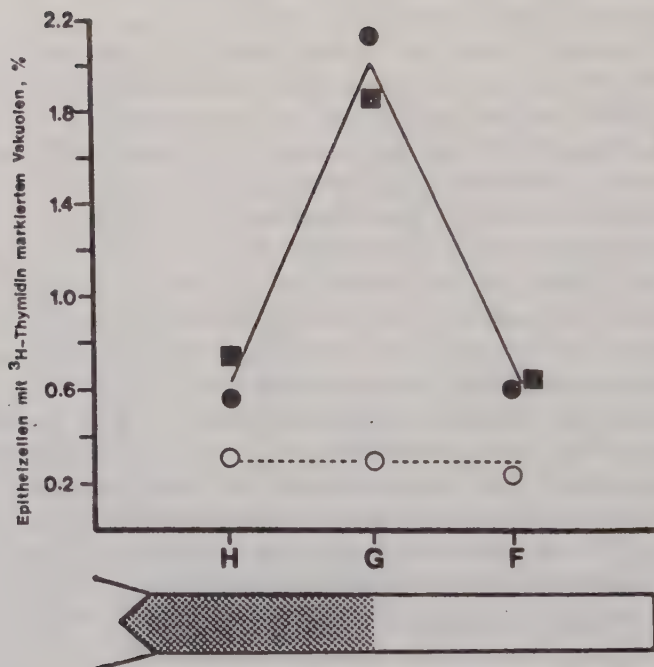


**Fig.10.** Häufigkeit von Epithelzellen mit Phagozytosevakuolen in verschiedenen Gewebeabschnitten. Nach einigen Tagen Parabiose wurden 8-12 Transplantate in 3 Teile getrennt (H= Kopfreion, G = Rumpfreion, F = Fußreion), mazeriert, nach Feulgen mit Lichtgrün als Gegenfarbe gefärbt und der Prozentsatz an Epithelzellen, die Phagozytosevakuolen enthalten, ermittelt. Untersuchte Transplantate:  
 (●) H.attenuata/H.oligactis, 1 Tag nach Transplantation.  
 (▲) H.attenuata/H.oligactis, 3 Tage nach Transplantation.  
 (◆) H.oligactis/H.attenuata, 3 Tage nach Transplantation.  
 Kontrollen: (○) H.attenuata/H.attenuata, 3 Tage nach Transplantation. (Δ) H.oligactis/H.oligactis, 3 Tage nach Transplantation. (□) H.attenuata, H.oligactis (♂), Standardtiere.

in xenoplastischen Transplantaten radioaktiv markiert, indem diesen Polypen für 3 Tage in 12-stündigen Intervallen  $^3\text{H}$ -Thymidin in den Gastralraum injiziert wurde. Mit diesem Verfahren werden etwa 80% der Epithelzellen und 100% der IZ markiert (Campbell und David, 1972; Bosch und David, 1984). Anschließend wurden apikale Hälften von markiertem H.attenuata oder H.oligactis Gewebe auf unmarkierte distale Hälften der anderen Art transplantiert. Nach drei Tagen der Parabiose wurden die xenoplastischen Transplantate in Kopf (H), Verwachungsregion (G) und Fußregion (F) getrennt und separat mazeriert. Nach der Autoradiographie wurde der Anteil der Epithelzellen bestimmt, der radioaktiv markierte Vakuolen enthielt. Fig.7b zeigt eine solche Epithelzelle, die zwei  $^3\text{H}$ -Thymidin markierte Vakuolen beinhaltet. Fig.11 zeigt, daß im Bereich der Verwachungsnaht etwa dreimal mehr Epithelzellen mit markierten Vakuolen gefunden wurden als in den anderen Körperregionen. 1-2% der Epithelzellen xenoplastischer Transplantate enthielten in der Verwachungsregion markierte Vakuolen. In heteroplastischen att/att Kontroll-Transplantaten konnte dieser Anstieg nicht beobachtet werden. Basale wie apikale Hälften von att/oli und oli/att Transplantaten wiesen eine ähnliche Phagozytoseaktivität (0.6%) auf.

Die Befunde dieser Markierungsexperimente zeigen, daß tatsächlich fremde Hydra Zellen phagozytiert wurden. Markierte Vakuolen wurden unabhängig davon, welcher Partner in den Transplantaten markiert war, gefunden.

Die Experimente belegen, daß sowohl H.attenuata als auch H.oligactis Epithelzellen in der Lage sind, Zellen fremder Arten zu phagozytieren. Da in heteroplastischen Kontroll-Transplantaten keine Zellen phagozytiert werden (Fig.10, Fig.11), kann man schließen, daß Epithelzellen von Hydra fähig sind, "nicht-selbst" zu erkennen und dagegen zu reagieren.



**Fig. 11.** Häufigkeit von Epithelzellen mit  $^3\text{H}$ -Thymidin markierten Phagozytosevakuolen in verschiedenen Gewebeabschnitten. Standardtiere wurden mit  $^3\text{H}$ -Thymidin pulsmarkiert (100  $\mu\text{Ci/ml}$ ). 1 Stunde später wurden apikale Hälften von markierten *H. attenuata* auf distale Hälften von unmarkierten *H. oligactis* transplantiert (und umgekehrt). Nach 3 Tagen Parabiose wurden 10-11 Transplantate in 3 Teile getrennt (H= Kopfregion, G = Rumpffregion, F = Fußregion) und nach Mazeration und Autoradiographie der Prozentsatz der Epithelzellen, die  $^3\text{H}$ -Thymidin markierte Phagozytosevakuolen enthalten, bestimmt. Untersuchte Transplantate (\* =  $^3\text{H}$ -Thymidin markierter Partner):

(■) *H. attenuata*\* / *H. oligactis*. (●) *H. attenuata* / *H. oligactis*\*. Kontrolle: (○) *H. attenuata* / *H. attenuata*\*.

### 3.1.2.6. Gibt es eine Art immunologische Gedächtnisreaktion?

Bei einer *Scleractinia* Koralle führte eine mehrere Wochen nach der Primärreaktion durchgeführte erneute Konfrontation mit dem gleichen Antigen zu einer verstärkten Zweitreaktion (Hildemann et al., 1977). Die funktionelle Grundlage dieser Reaktion ist

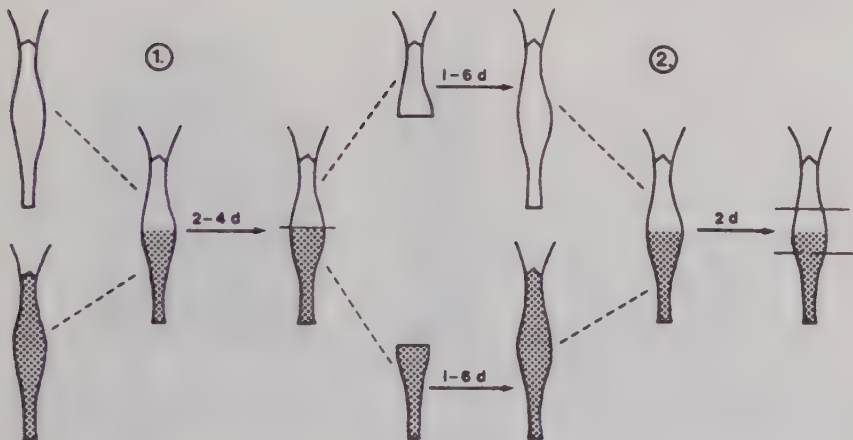
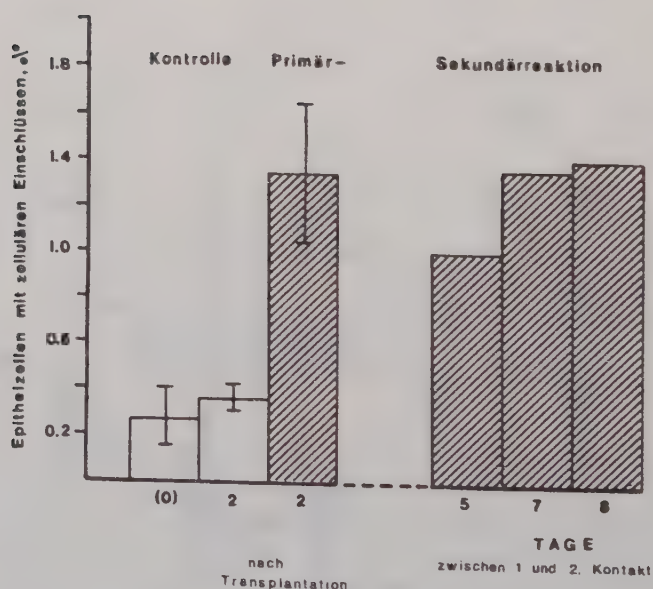


Fig.12. Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Suche nach einer immunologischen Gedächtnisreaktion. d = Tage.

unklar. Im Gegensatz dazu konnte weder bei den verwandten *Gorgonia* Korallen (Theodor, 1970) noch bei See-Anemonen (Lubbock, 1980) eine derartige Gedächtnisreaktion beobachtet werden.

Um eine derartige Zweitreaktion bei Hydra zu finden, wurden att/oli Transplantate hergestellt (Fig.12) und die Primärtransplantate dann 2-4 Tage nach Transplantation getrennt. Die isolierten Hälften wurden nun für weitere 2-6 Tage kultiviert. Anschließend wurden die gleichen Partner



**Fig.13.** Anteil der Epithelzellen mit Phagozytosevakuolen in Primär und Sekundärreaktion. Zur Kontrolle wurde der Phagozytose-Index in nicht transplantierten Standardtieren (0) und in heteroplastischen Transplantaten 2 Tage nach Transplantation ermittelt.

erneut aufeinander transplantiert, einige Tage kultiviert und schließlich das Ausmaß der Phagozytose in Feulgen-gefärbten

Mazerationspräparaten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig.13 dargestellt. In der Zweitreaktion wurden im Bereich der Verwachsungsnaht 1.5-2 % der Epithelzellen mit Phagozytosevakuolen gefunden. Die Zweitreaktion war damit der Primärreaktion durchaus ähnlich. Auch in der Zweitreaktion konnte in keinem Fall eine Abstoßung beider Hälften beobachtet werden. Die Ergebnisse geben daher keinen Hinweis auf die Existenz eines immunologischen Gedächtnisses.

### 3.1.3. DISKUSSION DER XENOPLASTISCHEN TRANSPLANTATE

#### 3.1.3.1. "Selbst/nicht-selbst" Erkennung und die Elimination von fremden Zellen

Die Ergebnisse zeigen, daß es in Transplantaten zwischen H.attenuata und H.oligactis eine kontinuierliche Verdrängung von H.attenuata Epithelzellen gibt (Fig.2). Fig.3 verdeutlicht, daß die Verdrängung von H.attenuata durch H.oligactis nicht auf einer geänderten Rate der Epithelzellproliferation beruht. Die Ergebnisse legen vielmehr nahe, daß die Verdrängungsreaktion von Phagozytoseaktivität der Epithelzellen beider Partner begleitet ist (Fig.7b). Da in allen Fällen H.oligactis H.attenuata verdrängt (Fig.2), kann man schließen, daß H.oligactis effizienter im Phagozytieren von H.attenuata ist als umgekehrt.

Die Ergebnisse zeigen ferner, daß die Verdrängung auch die Zellen der IZ-Linie betrifft. Fig.6B und Fig.8 zeigen, daß Desmonemen von H.oligactis in isolierten H.attenuata Hälften verdrängt und eliminiert werden. Der umgekehrte Fall, die Verdrängung von H.attenuata Desmonemen konnte nicht direkt demonstriert werden, da solche Nematoblasten in der H.oligactis Hälfte der Transplantate nicht gefunden wurden (Fig.8). Trotzdem gibt es Grund zur Annahme, daß auch Zellen der IZ-Linie von H.attenuata verdrängt werden. Die experimentellen

Befunde zeigten, daß eine beträchtliche Zahl von H.attenuata IZ (9%) in die H.oligactis Hälfte von oli/att Transplantaten wandert. Es wurden jedoch keine differenzierenden H.attenuata Desmonemen in H.oligactis Hälften gefunden. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür liegt in der effektiven Phagozytose dieser Zellen durch H.oligactis Epithelzellen. Eine solche Erklärung steht in Übereinstimmung mit der erhöhten Zahl von phagozytierenden Epithelzellen in der H.oligactis Hälfte von att/oli Transplantaten (Fig.10). Darüberhinaus wurden in oli/att Transplantaten, in denen H.attenuata mit <sup>3</sup>H-Thymidin vormarkiert war, Epithelzellen mit markierten Vakuolen in der H.oligactis Hälfte gefunden und zwar in Regionen, die weit entfernt von der Verwachsungsgrenze waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine erhöhte Phagozytoserate ist vermutlich auch für die Abwesenheit von H.attenuata Desmonemen in den Tentakeln der oli/att Transplantate verantwortlich (Fig.5B).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß Hydra fremde Hydra Zellen sowohl der Epithel- als auch der IZ-Linie erkennt und durch phagozytierende Epithelzellen eliminiert. Es liegt nahe anzunehmen, daß die Erkennungsreaktion durch Zell-Oberflächen-Moleküle erfolgt und daß Zellen beider Linien diese Erkennungs-Signale exprimieren. Solche Erkennungs-Signale sind formal gleich den Histokompatibilitäts-Antigenen der Zellen höherer Organismen.

Eine molekulare Charakterisierung der Erkennungssignale von Hydra und deren Vergleich mit bekannten Histokompatibilitäts-Antigenen höherer Organismen könnte interessante Aufschlüsse bezüglich der stammesgeschichtlichen Entstehung der "selbst/nicht-selbst" Erkennungsmechanismen liefern.

### 3.2.3. Ältere Arbeiten zur Kompatibilität von xenoplastischen Transplantaten

Die hier vorgestellten Ergebnisse bestätigen und ergänzen frühere Untersuchungen an att/oli Transplantaten. Issayev

(1924), Goetsch (1924) sowie Kolenkine (1958, 1971) beobachteten eine graduelle Verdrängung von H.attenuata Gewebe (Epithelzellen) in Transplantaten zwischen H.attenuata und H.oliqactis. Goetsch (1924) konnte darüberhinaus durch Identifikation der Nematoblasten in Ganztierpräparaten die Verdrängung von Zellen der IZ-Linie demonstrieren. Obwohl er in den meisten Fällen eine vollständige Verdrängung der H.attenuata Nematocyten beobachtet, beschreibt er ein Transplantat, das selbst 2 Monate nach Transplantation noch einige H.attenuata Nematocyten enthielt. Goetsch schlägt vor, daß dieses Tier eine stabile Mischung von IZ beider Arten enthält. Im Gegensatz dazu ergaben die hier beschriebenen Experimente keinerlei Hinweis für eine stabile Durchmischung der IZ in xenoplastischen Transplantaten (Fig.5 und Fig.6). Der von Goetsch berichtete Einzelfall wird daher als ein Beispiel angesehen, in dem die vollständige Verdrängung von H.attenuata verzögert ist. Insgesamt stimmen meine Ergebnisse daher gut mit den früheren Beobachtungen an att/oli Transplantaten überein.

Beobachtungen von Lee und Campbell (1979) an IZ/Epithelzell Chimären von H.oliqactis und H.attenuata scheinen dagegen mit den hier beschriebenen Beobachtungen nicht in Übereinstimmung zu stehen. Die Autoren ließen in epitheliales (d.h. IZ-freies) H.attenuata Gewebe IZ von H.oliqactis einwandern. Anschließend konnte in diesen Chimären, die bis zu 6 Monaten kultiviert wurden, während des gesamten Beobachtungszeitraumes die Anwesenheit der H.oliqactis IZ-Linie nachgewiesen werden. Die Chimären zeigten allerdings starke Verhaltensdefekte, die nach Ansicht von Lee und Campbell auf eine abnormale IZ-Differenzierung sowie auf Zell-Inkompatibilitäten zwischen den beiden Arten zurückzuführen sind. Die Tatsache, daß H.oliqactis-IZ in diesen Chimären nicht eliminiert wurden, ist im Hinblick auf meine eigenen Beobachtungen recht erstaunlich. Obwohl im Augenblick diese Diskrepanz ungeklärt bleibt, ist es allerdings denkbar, daß bei Hydra für die Entfernung von fremden Zellen die Anwesenheit der IZ notwendig ist und daß es deshalb in IZ-freiem H.attenuata Gewebe zu keiner Verdrängungsreaktion kommen konnte.

### 3.1.3.3. Epithelzellen als Effektorzellen des Immunsystems

Die Erkennungs- und Histokompatibilitätsreaktionen werden bei Hydra von Epithelzellen durchgeführt (Fig.9). Die Beobachtung, daß an der Histokompatibilitätsreaktion Epithelzellen unmittelbar beteiligt sind, mag überraschen, da bei Invertebraten wie bei Vertebraten an den Immunreaktionen im allgemeinen spezielle Phagozyten beteiligt sind (Lackie, 1980). In diesem Zusammenhang soll daher erwähnt werden, daß bereits früher bei Hydra gezeigt wurde, daß unter gewissen Umständen sowohl ektodermale wie auch entodermale Epithelzellen zu aktiven Phagozyten werden können (Campbell, 1976; Fujisawa und David, 1984; Bosch und David, 1984; Kobatake und Sugiyama, 1986). Ferner, auch bei einer Reihe von Organismen, die durchaus spezialisierte Phagozyten besitzen, kommt es unter bestimmten Umständen vor, daß Epithelzellen benachbarte Zellen phagozytieren (z.B. Hepatocyten der Ratte, Bursch et al., 1984). Diese Art des Zelltods, der von Wyllie et al. (1980) als "Apoptose" bezeichnet wurde, scheint bei Vertebraten wie auch bei Invertebraten weitverbreitet zu sein. Da die hier beschriebenen Experimente zeigen, daß bei den phylogenetisch alten Coelenteraten fremde Zellen durch Apoptose eliminiert werden, ist es denkbar, daß diese Art des Zelltodes das evolutionäre Relikt einer stammesgeschichtlich frühen Immunantwort darstellt.

### 3.1.3.4. Mögliche Bedeutung der "selbst/nicht-selbst" Erkennung bei Hydra

Die Bedeutung der "selbst/nicht-selbst" Erkennung ist bei Hydra nicht offensichtlich, da diese Tiere als solitäre Polypen existieren, die unter normalen Bedingungen nicht unmittelbar mit fremdem Gewebe konfrontiert sind. Zur Frage der möglichen Funktion eines derartigen Erkennungssystems im natürlichen Habitat hat Buss (1982) eine interessante Hypothese

vorgeschlagen. Er fordert die Existenz von "selbst/nicht-selbst"-Erkennung bei all denjenigen Organismen, die sich asexuell durch Knospung vermehren. Die asexuelle Vermehrung bedinge, daß diese Organismen eine kontinuierlich proliferierende und multipotente Zelllinie besitzen, aus der während der sexuellen Lebensphase Gameten gebildet werden. Solche Organismen seien daher anfällig für eine "Infektion" durch variante multipotente Zelllinien, die mit der totipotenten Wirts-Zelllinie um Positionen in der Keimbahn wetteifern ("somatic cell parasitism"-Hypothese, Buss, 1982; Buss und Green, 1986). Nur ein effizientes "selbst/nicht-selbst" Erkennungssystem verhindere daher in diesen Organismen ein Eindringen somatischer Varianten.

Die im zweiten Teil dieser Arbeit (3.2) beschriebenen Experimente zeigen, daß die interstitiellen Stammzellen von Hydra multipotent sind in dem Sinn, daß jede dieser Stammzellen sowohl zu somatischen Zellen wie auch zu Gameten ausdifferenzieren kann. Der "somatic cell parasitism"-Hypothese (Buss, 1982; Buss und Green, 1986) zufolge müssen daher Coelenteraten ein "selbst/nicht-selbst" Erkennungssystem insbesondere für die IZ-Linie entwickelt haben.

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß Hydra tatsächlich zu "selbst/nicht-selbst" Erkennung sowie zu Histoinkompatibilitätsreaktionen in der Lage ist.

### 3.2. Klonierung von Stammzellen im Reaggregationsversuch: Nachweis der Multipotenz bezüglich Keimbahn/Soma- Differenzierung

#### 3.2.1. Einführung

Der zweite von mir benutzte in vivo-Klonierungsansatz wurde ursprünglich entwickelt, um Stammzellen des hämatopoetischen Systems zu charakterisieren (Till und McCulloch, 1961). Till und McCulloch injizierten Knochenmark-Stammzellen in Röntgenbestrahlte Mäuse; die injizierten Stammzellen besiedelten anschließend die Milz und andere hämatopoetische Organe der Wirtstiere und gründeten leicht erkennbare Klone.

In einem ähnlichen Experiment klonierte ich Stammzellen von H. magnipapillata in Wirts-Gewebe, das temperatur-sensitive IZ enthält. Temperatur-resistente Stammzellen werden in dieses Gewebe mittels der Dissoziations-Reaggregationsmethode (Gierer et al., 1972) eingeführt. Zur Herstellung von Stammzellklonen wird eine kleine Zahl von Spenderzellen mit einer großen Zahl von Wirtszellen reaggregiert. Wird eine genügend niedrige Zahl von Spenderzellen zu den Wirtszellen gegeben, enthalten die meisten Reaggregate keine Spenderzellen. In den wenigen Aggregaten, die Spenderzellen enthalten, ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß diese Zellen auf eine einzelne Zelle zurückzuführen sind.

In früheren Klonierungsversuchen wurden die Stammzellen des Wirtsgewebes durch eine Senfgas- oder Hydroxy-Harnstoff-Behandlung entfernt (David und Murphy, 1977; Bode et al, 1976; Littlefield, 1985) und anschließend die Spender-Stammzellen in IZ-freiem Wirtsgewebe kloniert. Da Senfgas- oder Hydroxy-Harnstoff- behandeltes Gewebe nach 2-3 Wochen abstirbt, die Gametogenese aber mehrere Wochen in Anspruch nimmt, strebte ich eine in-vivo Klonierungsmethode an, die es erlaubt, Stammzellen langfristig zu kultivieren. Zu diesem Zweck wurden Mutanten von H. magnipapillata, die durch eine genetisch markierte IZ-Linie charakterisiert sind (Sugiyama and Fujisawa,

1977), verwendet. Als Wirt verwendete ich Mutante "sf-1", deren IZ temperatur-sensitiv sind und bei 24°C eliminiert werden. Als Spender-Stamm diente Mutante "ms-1", deren IZ temperatur-resistent sind und zu immobililen Spermien differenzieren. Der gewählte Klonierungsansatz ermöglichte eine gemeinsame Kultur von hinzugefügten Spenderzellen und allen Zellen des Wirtsgewebes. Ferner konnte auf eine chemische Vorbehandlung des Wirtsgewebes, die allgemeine toxische Effekte sowie eine hohe Mortalitätsrate mit sich bringt (Sinclair, 1965; Littlefield, 1985), verzichtet werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß Stammzellen von H.magnipapillata multipotent sind in dem Sinn, daß jede Stammzelle sowohl zu somatischen Zellen wie auch zu Gameten ausdifferenzieren kann. Die Ergebnisse geben keine Hinweise für die Existenz von Subpopulationen von IZ mit beschränkter Differenzierungskapazität (Bosch und David, 1986b).

### 3.2.2. ERGEBNISSE

#### 3.2.2.1. Herstellung von Stammzell-Klonen

Um Stammzell-Klone herzustellen, wurde sf-1 Wirtsgewebe und ms-1 Spendergewebe nach der von Gierer et al (1972) beschriebenen Methode dissoziiert. Die Methode wurde modifiziert, da bei H.magnipapillata - im Gegensatz zur bislang verwendeten Art H.attenuata - große Zellverluste auftraten und die Überlebensrate der Reaggregate gering war. Sf-1 Gewebe wurde daher in Zell-Kultur-Medium (siehe MATERIAL UND METHODEN) mit einer Technik, die in der Zellbiologie bei der Herstellung von Primärkulturen Anwendung findet ("Siebtechnik", z.B. Gebicke-Härter et al., 1984) dissoziiert. Im wesentlichen wird dabei Hydra-Gewebe durch ein Metallsieb gedrückt. Die Methode erlaubt eine schonende Dissoziation, verringert Zellschädigungen und führt zu einer Überlebensrate der Aggregate von etwa 90%. Zur Herstellung von Stammzellklonen wurde eine kleine Zahl von ms-1-Spenderzellen mit einer großen

Zahl von sf-1-Wirtszellen reaggregiert (Fig.14). Wenn die Verteilung von ms-1 Stammzellen in einer Reihe solcher Aggregate zufällig ist und wenn die Wahrscheinlichkeit, daß

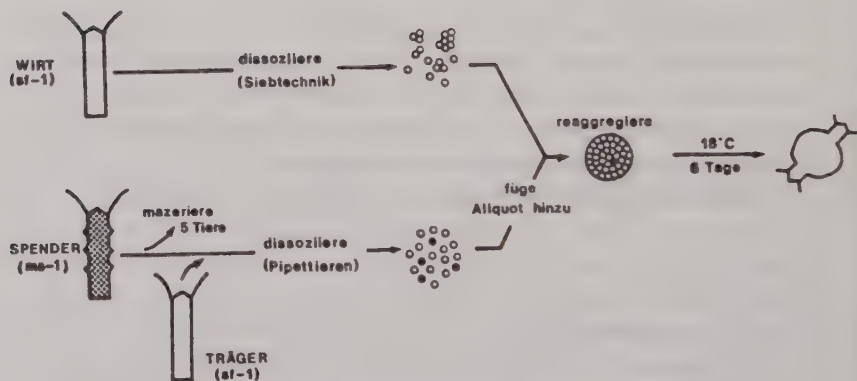


Fig.14. Schematische Darstellung des Vorgehens beim Klonieren von interstitiellen ms-1 Stammzellen (●) in Aggregaten von sf-1 Gewebe.

Aggregate eine Stammzelle erhalten gering ist, dann folgt die Zahl der Aggregate, die Stammzellen erhalten, der Poisson-Verteilung,  $P(x) = n^x e^{-n} / x!$  (David und Murphy, 1977). Aus dem Anteil der Aggregate, die keine Klone erhalten haben [=  $P(0)$ ] kann nun unter den zugegebenen Zellen die mittlere Anzahl der Stammzellen ( $n$ ) ermittelt werden. Über die Poisson-Verteilung kann man schließlich für eine bestimmte Menge zugegebener Stammzellen die Häufigkeit von Aggregaten mit keinem, einem oder mehreren Klonen statistisch errechnen, da

$P(0) = e^{-n}$  ("Einzel-Treffer" Poisson Statistik, Sachs, 1974).  
 Zum Beispiel: Wenn bei einer bestimmten Menge zugegebener ms-1 Zellen 81.9% der Aggregate keine Klone erhalten [=  $P(0)$ ], dann erhalten die restlichen 18.1% (=  $P$ ) einen oder mehrere Klone. Genau genommen erhalten 16.4% der Aggregate eine einzige Stammzelle, 1.6% erhalten 2 und 0.1% erhalten 3 und mehr Stammzellen (Tab.H in Batschelet, 1980). Die folgende Gleichung fasst die Kalkulationen zusammen, die benützt wurden, um die hinzugefügte Zahl der IZ pro Aggregat zu bestimmen:

$$[\# \text{ ms-1 Polypen/Diss.vol.}] \times [\# \text{ IZ/Polyp}] \times [\text{Aliquot Vol.}/\# \text{ Aggr.}] = \# \text{ IZ/Aggregat.}$$

Für verschiedene Mengen zugegebener ms-1 Zellen wurde über  $P(0) = e^{-n}$  die mittlere Zahl zugegebener Stammzellen ( $n$ ) pro Aggregat (= mittl. CFU/Aggregat) ermittelt. Die Anzahl der CFU/ml wurde dann über

$$[\text{mittl.CFU/Aggregat}] / [\text{ml/Aggregat}]$$

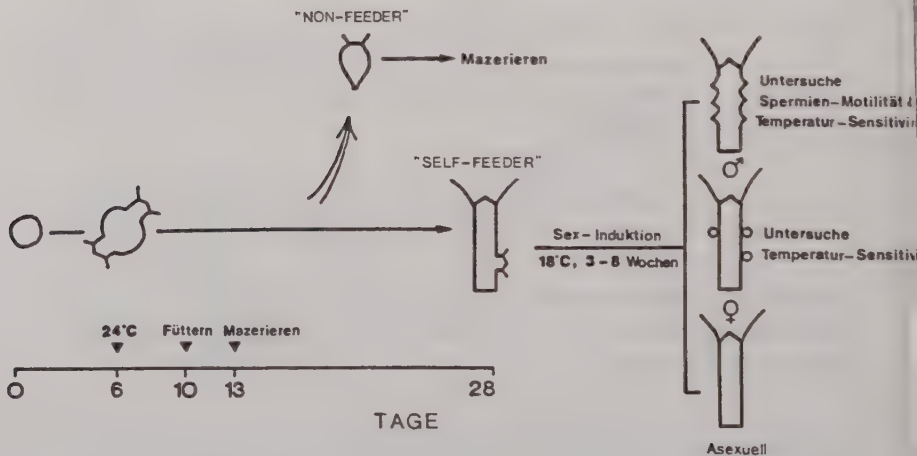
erhalten.

Es wurden Parallelansätze von je 20 - 30 Aggregaten pro Konzentration hergestellt, die 0.05 - 2 CFU pro Aggregat erwarten ließen.

### 3.2.2.2. Analyse der Stammzellklone

Das Vorgehen bei der Analyse der Stammzell Klone ist in Fig.15. schematisch dargestellt. Um die IZ des Wirtsgewebes (sf-1) zu entfernen, wurden die Aggregate vom Tag 6 nach Reaggregation an bei der restriktiven Temperatur von 24°C gehalten. Vom Tag 10 nach Reaggregation an wurden die Tiere täglich ad libidum mit Salinenkrebssen gefüttert. Um den Anteil der Aggregate, die IZ enthalten [ $1-P(0)$ ] zu ermitteln, wurde am Tag 13 aus jeder Konzentrationsklasse eine zufällige Probe von 10 - 15 Aggregaten mazeriert und auf die Anwesenheit von IZ überprüft.

Bis etwa Tag 16 waren alle Tiere - auch diejenigen, die keine temperatur-resistenten ms-1 IZ erhalten hatten - aufgrund der Anwesenheit von Wirts (sf-1) Nematocyten und Nervenzellen in der Lage, zu fressen. Danach konnte das Auftreten von zwei Gruppen von Tieren beobachtet werden. Wenn keine temperatur-resistenten Spenderzellen zu den Wirts-Aggregaten gegeben wurden, entwickelten sich alle Aggregate zu "non-feeder" (siehe 2.11); diesen Tieren fehlen Nematocyten



**Fig.15.** Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Analyse der Stammzell-Klone.

und Nervenzellen, die Tentakel sind verkürzt und der Rumpf stark aufgebläht, da die Tiere zu keiner Osmoregulation mehr fähig sind (Marcum und Campbell, 1978). In Konzentrationsklassen, in denen den Wirts-Aggregaten einige wenige Stammzellen zugefügt wurden, entwickelten sich die meisten Aggregate zu "non-feeder"; einige wenige Aggregate aber zeigten die Fähigkeit, Beutetiere zu fangen und zu fressen, da

sie temperatur-resistente Spenderzellen erhalten hatten, die zu Nematocyten und Nervenzellen differenzieren konnten. Solche "Self-Feeder" wurden schließlich zur Gametenbildung induziert und der Phänotyp der Gameten analysiert (siehe unten). Aufgrund der genetischen Marker von Wirt- und Spender-IZ konnte schließlich die Spender-Abkunft der Gameten überprüft werden.

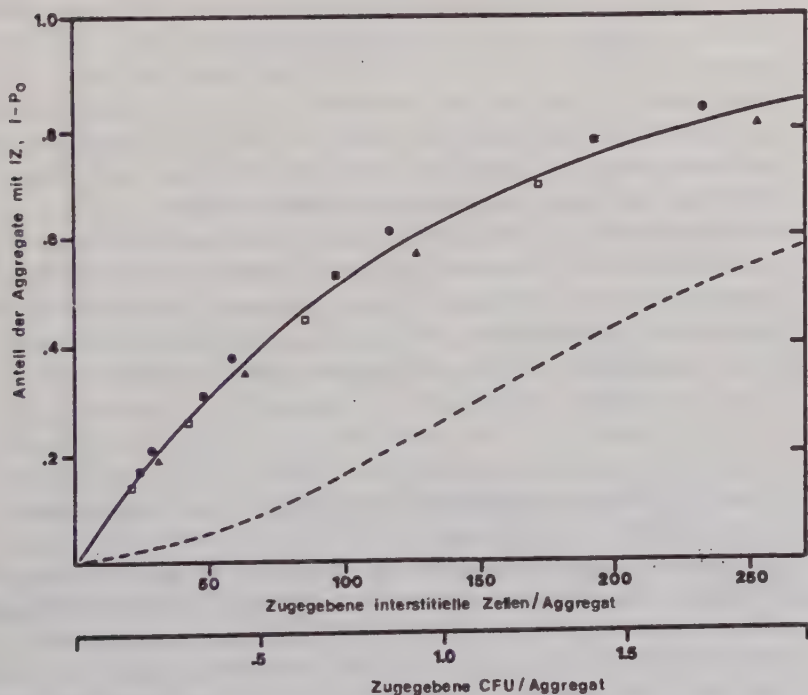


Fig.16. Bildung von Stammzell-Klonen durch temperatur-resistente ms-1 IZ. Die durchgezogene Kurve wurde aus dem Mittelwert von 4 unabhängigen Experimenten gebildet und stimmt mit der Annahme von "Einzel-Treffer"-Poisson Statistik [ $P = 1 - P(0) = 1 - e^{-n}$ ] überein. Die unterbrochene Kurve beruht auf der Annahme, daß 2 Stammzellen zur Bildung eines Klonen benötigt werden [ $P = 1 - e^{-n} - ne^{-n}$ ].

Aggregate, die am Tag 13 mazeriert wurden, wurden auf die Anwesenheit von großen, einzeln oder paarweise vorliegenden IZ überprüft. Aggregate, die temperaturresistente IZ enthielten, hatten zwischen 100 und 500 IZ. Kontroll-Aggregate, zu denen keine temperaturresistenten IZ zugefügt wurden, enthielten keine IZ ( = weniger als 10 IZ pro Aggregat).

Das Ergebnis von 4 unabhängigen Experimenten, in denen eine zunehmende Zahl von ms-1 Zellen zu sf-1 Aggregaten gegeben wurde, ist in Fig.16 gezeigt. Mit steigender Zahl an hinzugefügten ms-1 Zellen nimmt der Anteil der Aggregate, der IZ enthält, asymptotisch auf 100% zu. Die durchgezogene Kurve wurde aus dem Mittelwert der 4 Experimente und unter der Annahme, daß eine Stammzelle einen Klon bildet ("Einzel-Treffer"-Poisson Statistik), konstruiert. Die unterbrochene Kurve beruht auf der Annahme, daß 2 Stammzellen benötigt werden, um einen Klon zu gründen. Die zweite Abszisse gibt die Zahl der CFU/ml an und zeigt, daß sich unter 135 hinzugefügten IZ eine Klon bildende Zelle befand.

### 3.2.2.3. Wachstumsbedingungen der klonierten Stammzellen

Extensive Proliferation ist ein wesentliches Merkmal von Stammzellen und Voraussetzung für das weitere Studium dieser Zellen. Wir ermittelten daher die Wachstumsrate von ms-1 Stammzellklonen in Aggregaten, die statistisch etwa 0.5 CFU pro Aggregat enthielten. Die Klone wurden entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll (Fig.15) von Tag 6 nach Reaggregation an bei der restriktiven Temperatur kultiviert, um die Wirts-IZ zu entfernen. Vom Tag 10 an wurden die Aggregate ad libidum mit Artemia gefüttert. Am Tag 17 nach Reaggregation wurde die Gesamtzahl der 1s+2s pro Aggregat ermittelt. Unter diesen Bedingungen wurden im Durchschnitt 238 IZ pro Klon gefunden (Tab.1).

Tab.1. WACHSTUM VON MS-1 IZ IN SF-1 GEWEBE.

| sf-1 1s+2s<br>anwesend für | Zahl der untersuchten<br>Aggregate <sup>1</sup> | Zahl der ms-1 1s+2s<br>( $\pm$ S.D.) |
|----------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 6 Tage                     | 12                                              | TAG 17<br>238 ( $\pm$ 90.5)          |
| 16 Tage                    | 6                                               | TAG 19<br>214 ( $\pm$ 96)            |

<sup>1</sup> Alle Aggregate enthielten weniger als 0.6 CFU/Aggregat.

Um den Einfluß der IZ des Wirts (sf-1) auf das Wachstum von ms-1 Klonen zu untersuchen, wurden Klone für 16 Tage bei der permissiven Temperatur von 18°C kultiviert. Anschließend wurden sie für 3 Tage bei 24°C gehalten um die sf-1 Wirtszellen zu entfernen, dann mazeriert und die Anzahl der IZ bestimmt. Tab.1 zeigt, daß diese Klone am Tag 19 im Durchschnitt 214 IZ pro Aggregat enthielten. Die Ergebnisse zeigen, daß zu sf-1 Zellen hinzugegebene ms-1 Stammzellen unabhängig von der An- oder Abwesenheit von sf-1 IZ überleben und proliferieren. Die Ergebnisse (Tab.1) deuten aber auch eine leicht verminderte Wachstumsrate der Stammzellen in Gegenwart von IZ des Wirts an. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit der Hypothese einer negativen Regulation des Stammzell-Wachstum durch die Dichte der Stammzellen im Gewebe (Sproull & David, 1979; David & MacWilliams, 1978).

#### 3.2.2.4. Räumliche Anordnung der Stammzell-Klone im Aggregat

Um die räumliche Anordnung der Stammzell-Klone in den Aggregaten zu studieren, wurde eine Reihe von Aggregaten 10 und 13 Tage nach Reaggregation in Alkohol fixiert und mit Toluidin-Blau gefärbt. Klone werden dabei sichtbar, da sich IZ

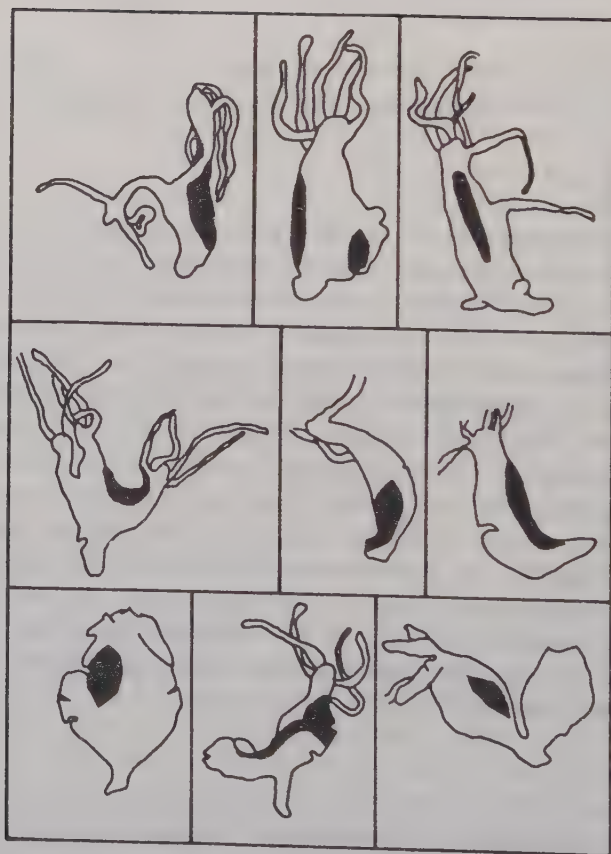


Fig.17. Lokalisation von Stammzell-Klonen in regenerierten Aggregaten. Camera lucida Zeichnungen von 13 Tage alten Regeneraten. Die temperatur-sensitiven IZ des Wirts wurden eliminiert, indem die Aggregate vom Tag 11 an bei 24°C kultiviert wurden.

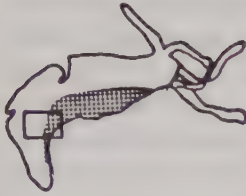


Fig.18. Camera lucida Zeichnung: 13 Tage altes Regenerat, das mit Toluidin-Blau gefärbt wurde und die klonale Lokalisation der temperaturresistenten interstitiellen Stammzellen zeigt. Foto: Teil des ms-1 Zell-Klones. Die Wirtszellen wurden entfernt, indem das Aggregat vom Tag 11 an bei 24°C kultiviert wurde. X 150.

mit Toluidin-Blau sehr viel intensiver anfärben lassen als das umgebende Epithel (Diehl und Burnett, 1964). IZ-Klone konnten in allen Fällen als isolierte Zell-Ansammlungen im Ektoderm angesprochen werden. In Konzentrationsbereichen mit weniger als einer CFU/Aggregat hatten diejenigen Aggregate, die IZ enthielten, meist einen deutlichen "Fleck" von mehreren hundert IZ (Fig.17 und Fig.18); die Klone waren stets entlang der apikal-basal Körperachse angeordnet. Diese Art der Anordnung könnte auf der apikal-basalen Wanderung der IZ (Heimfeld und Bode, 1984a) beruhen. In Konzentrationsbereichen mit mehr als

einer CFU/Aggregat hatten einige wenige Aggregate einen einzelnen Fleck von IZ, während andere Aggregate eine große Zahl von IZ enthielten. Obwohl in diesen Aggregaten größere Gewebeabschnitte beobachtet werden konnten, die frei von IZ waren, konnten einzelne Klone nicht mehr identifiziert werden. Eine ähnliche Verteilung der IZ wurde in Klonen gefunden, die vom Tag 6 an entsprechend dem Standard-Versuchsprotokoll (Fig.15) bei 24°C gehalten wurden. Die Anzahl der Toluidin-blau gefärbten IZ pro Klon war den durch Mazeration ermittelten Werten (vgl. Tab.1) ähnlich.

### 3.2.2.5. Zellzusammensetzung der Aggregate

Um den Anteil der Aggregate, die keine IZ erhalten hatten [= P(0)], zu bestimmen, wurde eine Probe von 10-15 Aggregaten aus jeder Konzentrationsklasse am Tag 13 nach Dissoziation/Reaggregation mazeriert. Die Zellzusammensetzung dieser Aggregate ist in Tab.2 gezeigt. Die Ergebnisse von 6 unabhängigen Versuchen sind entsprechend der Zahl der

Tab.2. ZELL-ZUSAMMENSETZUNG DER AGGREGATE 13 TAGE NACH REAGGREGATION<sup>1</sup>.

| KALKULIERTE<br>CFU/AGGR. <sup>2</sup> | ZAHL<br>AGGR. | OHNE<br>IZ <sup>3</sup> | MIT<br>IZ | MIT IZ<br>UND NEMATOBlasten |
|---------------------------------------|---------------|-------------------------|-----------|-----------------------------|
| 0-0.1                                 | 32            | 31                      | 1         | 1                           |
| 0.1-0.2                               | 66            | 57                      | 9         | 9                           |
| 0.2-0.3                               | 52            | 44                      | 9         | 9                           |
| 0.3-0.6                               | 75            | 51                      | 24        | 24                          |
| Total                                 | 225           | 183                     | 42        | 42                          |

<sup>1</sup> Basiert auf Mazervationsanalyse von 6 unabhängigen Experimenten.

<sup>2</sup> Kalkuliert aus P(0) in jedem Experiment; die Ergebnisse der einzelnen Experimente sind entsprechend der mittleren Zahl von CFU/Aggr.aufgelistet.

<sup>3</sup> Es wurden keine IZ ( $\ll$  10/Aggr.) gefunden nach Untersuchung von wenigstens 20% der Gesamtzellen in jedem Aggregat.

CFU/Aggregat in verschiedenen Klassen aufgelistet. Die meisten Aggregate enthalten keine IZ. Mit zunehmender Zahl von hinzugefügten Stammzellen nimmt der Anteil der Aggregate, die IZ enthalten, zu. "Ohne IZ" bedeutet, daß nach Auszählen von mindestens 20% aller Zellen eines einzelnen Aggregates weniger als 10 IZ/Aggregat gefunden wurden. Alle Aggregate, in denen mehr als 10 IZ gefunden wurden, enthielten auch differenzierende Nematoblasten und Nematocyten. Es wurde kein Aggregat gefunden, das ausschließlich IZ enthielt.

Es wurde ferner die Zellzusammensetzung der Aggregate analysiert, die während des Beobachtungszeitraumes die Fähigkeit des selbstständigen Fressens verloren hatten ("non-feeder"). Diese Aggregate wurden 2-4 Tage nach Entdeckung dieser Eigenschaft mazeriert und analysiert. Tab.3 zeigt die Zellzusammensetzung dieser Aggregate aus Konzentrationsbereichen mit weniger als 1 CFU/Aggregat. Die meisten Tiere (386) enthielten keine IZ. In 14 Tieren konnte ich IZ finden. Jedes dieser Tiere enthielt differenzierende Nematoblasten, Nematocyten und Nervenzellen. Kein Tier enthielt nur IZ.

Tab.3. ZELL-ZUSAMMENSETZUNG DER "NON-FEEDER"<sup>1</sup>.

| ZAHL DER<br>AGGREGATE | OHNE<br>IZ <sup>2</sup> | MIT<br>IZ | MIT IZ<br>UND NEMATOBLASTEN |
|-----------------------|-------------------------|-----------|-----------------------------|
| 400                   | 386                     | 14        | 14                          |

<sup>1</sup> Basiert auf Mazerationsanalyse 3-4 Wochen nach Reaggregation.

<sup>2</sup> Es wurden keine IZ (<10/Aggr.) gefunden nach Untersuchung von wenigstens 20% der Gesamtzellen in einem Aggregat.

Um auszuschließen, daß sich in solchen, zur Nahrungsaufnahme unfähigen Aggregaten, eine Population von IZ befindet, die an

der Proliferation und Differenzierung gehindert ist, wurde eine Reihe solcher Aggregate über mehrere Wochen zwangsgefüttert und anschließend die Zellzusammensetzung bestimmt. In diesem Versuchsansatz wurden 133 Aggregate, unmittelbar nachdem sie die "non-feeder" Eigenschaft zeigten, für 3-6 Wochen per Hand mit 2-3 Artemia/Tag gefüttert und 4-6 Stunden später der Gastralraum dieser Tiere mit Hydramedium gespült (Marcum und Campbell, 1978; Littlefield, 1985). Fig.19 zeigt 3 typische "non-feeder" und einen "non-feeder", der für mehrere Wochen per Hand gefüttert wurde. Die abgebildeten Polypen sind gleich alt. Die Abbildung illustriert, daß in epithelialen (= IZ-freien) Tieren Zwangsfütterung zu Wachstum und Knospenbildung führt. Nach der Phase der Zwangsfütterung wurden die Tiere mazeriert



Fig.19. 8 Wochen alte "non-feeder" mit der typischen Morphologie von epithelialen Tieren (vgl. Marcum und Campbell, 1978). Die 3 Tiere auf der linken Seite wurden nicht gefüttert. Der Polyp auf der rechten Seite wurde für 6 Wochen per Hand gefüttert und bildete mehrere Knospen.

und auf die Anwesenheit von IZ hin untersucht. Die Zellzusammensetzung dieser Tiere ist in Tab.4 gezeigt. Die Mehrzahl der Polypen (116) enthielt keine IZ. 17 Aggregate enthielten IZ; alle diese Tiere enthielten daneben auch Nematoblasten und Nervenzellen. Kein Klon wurde gefunden, der IZ enthielt, die nicht differenzierten. Die 17 positiven Tiere enthielten in allen Fällen nur einige wenige IZ (etwa 0.05 IZ pro Epithelzelle). Im Augenblick kann nicht entschieden werden, ob diese Zellen, die offensichtlich zu somatischen Zellen (Nematocyten, Nervenzellen) differenzieren können, temperatur-resistent gewordene Wirtszellen oder langsam proliferierende Spenderzellen sind. 7 zwangsgefütterte "non-feeder" (nicht in Tab.4 aufgeführt) nahmen im Laufe

Tab.4. ZELL-ZUSAMMENSETZUNG DER PER HAND GEFÜTTERTEN "NON-FEEDER"<sup>1</sup>.

| ZAHLE DER<br>AGGREGATE | OHNE<br>IZ <sup>2</sup> | MIT<br>IZ | MIT IZ<br>UND NEMATOBLASTEN | IZ PRO<br>EPITHELZELLE |
|------------------------|-------------------------|-----------|-----------------------------|------------------------|
| 133                    | 116                     | 17        | 17                          | 0.047 ( $\pm$ 0.036)   |

<sup>1</sup> Die Aggregate wurden unmittelbar nach Auftreten der "non-feeder"-Eigenschaft (im allgemeinen 15 Tage nach Reaggregation) mit der Hand gefüttert. Die Zell-Zusammensetzung wurde durch Mazeration 3-6 Wochen nach Beginn der Zwangsfütterungsphase ermittelt.

<sup>2</sup> Es wurden keine IZ ( $\leq 10$ /Aggr.) gefunden nach Untersuchung von wenigstens 20% der Gesamtzellen in einem Aggregat.

der Versuchsperiode die selbstständige Nahrungsaufnahme wieder auf. Es ist denkbar, daß die Zahl der IZ in diesen Tieren zunächst nicht ausreichte, um das Auftreten der "non-feeder" Eigenschaften zu verhindern; Zwangsfütterungs-Bedingungen führten jedoch zur Proliferation dieser Zellen und schließlich zu einer genügend großen Zahl von IZ und Nematocyten, um ein selbstständiges Fressen wieder zu ermöglichen.

### 3.2.2.6. Gametendifferenzierung in Stammzell-Klonen

Um zu untersuchen, ob die Stammzellen von Hydra sowohl zu somatischen Zellen wie zu Gameten differenzieren können, wurden die Aggregate, die Stammzell-Klone enthielten, nach der in MATERIAL UND METHODEN beschriebenen Methode zur Gametenbildung induziert. Die Sexualphase wurde induziert, nachdem die Regenerate für 4 Wochen bei 24°C kultiviert worden waren und somatische Zellen differenzierten (vgl. Fig. 15). Aufgrund extensiver Proliferation bestand jeder Klon zu diesem Zeitpunkt aus mehreren (etwa 5-10) Polypen. Tab. 5 führt die Anzahl der gefundenen Klone und das Geschlecht der Polypen auf. Die Ergebnisse von 11 unabhängigen Experimenten sind entsprechend der Zahl der CFU/Aggregat in verschiedenen Klassen zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigen, daß in allen Klassen die Mehrheit der Klone (87 von 92) Gameten differenzierte. 5 Klone konnten bislang nicht zur Gametenbildung induziert werden. Aufgrund der genetischen Marker der verwendeten Mutanten konnte die Herkunft der Gameten überprüft werden. Es zeigte sich, daß alle untersuchten Klone 12 des Spenderstammes enthielten, d.h. temperaturresistent waren und zu immobilen Spermien differenzierten.

Die Ergebnisse in Tab. 5 zeigen, daß die Stammzellen von Hydra multipotent sind in dem Sinne, daß sie sowohl zu somatischen Zellen wie auch zu Gameten differenzieren können. Die Ergebnisse geben keinen Hinweis auf die Existenz einer separaten Keimbahn.

Darüberhinaus zeigen die Ergebnisse in Tab. 5, daß die meisten Stammzell-Klone (etwa 70%) weibliche Gameten differenzierten. In einigen wenigen Klonen (als "Hermaphroditen" bezeichnet) differenzierten im Verlauf des etwa einjährigen Beobachtungs-Zeitraumes einige Polypen Spermien und andere Eier. Da die eingesetzten Spenderzellen aus männlichen Polypen stammten, waren diese Ergebnisse durchaus unerwartet. Es zeigte sich jedoch, daß sie nicht auf den verwendeten Spenderstamm

Tab.5. SEXUELLER PHÄNOTYP VON MS-1 KLONEN IN SF-1 AGGREGATEN  
(ALLE KLONE DIFFERENZIIERTEN NERVENZELLEN UND NEMATOCYTEN)<sup>1</sup>.

| KALKULIERTE<br>CFU/AGGR. <sup>2</sup> | ZAHL DER KLONE |          |         | ♂ <sup>3</sup> | ♀ <sup>4</sup> | ♀ <sup>5</sup> |
|---------------------------------------|----------------|----------|---------|----------------|----------------|----------------|
|                                       | GESAMT         | ASEXUELL | SEXUELL |                |                |                |
| 0-0.1                                 | 2              | 0        | 2       | -              | 2              | -              |
| 0.1-0.2                               | 15             | 2        | 13      | 6              | 7              | -              |
| 0.2-0.3                               | 19             | 1        | 18      | 2              | 13             | 3              |
| 0.3-0.4                               | 12             | 1        | 11      | 4              | 7              | -              |
| 0.4-0.5                               | 15             | 0        | 15      | 1              | 13             | 1              |
| 0.5-1.0                               | 29             | 1        | 28      | 10             | 16             | 2              |
| GESAMT                                | 92             | 5        | 87      | 23             | 58             | 6              |

<sup>1</sup> Ergebnis von 11 unabhängigen Experimenten.

<sup>2</sup> Kalkuliert aus dem P(o) Anteil am Tag 13.

<sup>3</sup> Alle Tiere wurden untersucht und enthielten sowohl unbewegliche Spermien wie auch Temperatur-resistente IZ.

<sup>4</sup> 47 unter 58 Klonen enthielten Temperatur-resistente IZ. Die restlichen 11 Klone gingen verloren, bevor die Temperaturresistenz getestet werden konnte.

<sup>5</sup> In diesen Klonen, die aus mehreren (5-10) Polypen bestanden (siehe Text), entstanden während des etwa einjährigen Beobachtungszeitraumes in unregelmäßigen Abständen sowohl männliche wie weibliche Polypen.

beschränkt sind. Ich konnte bei Stammzell-Klonen eines anderen männlichen Stammes von H.magnipapillata ("nem-1", Sugiyama und Fuijsawa, 1977) die gleiche Beobachtung machen: Unter 7 Klonen differenzierte 1 Klon männliche Gameten, während 6 Klone weibliche Gameten bildeten.

Das unerwartete Auftreten von weiblichen Stammzellen in männlichen Polypen wird im 3. Teil dieser Arbeit (Absch. 3.3) ausführlich untersucht.

### 3.2.3. DISKUSSION DER KLONIERUNGSEXPERIMENTE

#### 3.2.3.1. Beweis der Multipotenz der Stammzellen.

Die Analyse mehrerer hundert Stammzell-Klone zeigte, daß sie alle sowohl Nervenzellen wie auch Nematocyten enthielten. Es wurde weder ein Klon gefunden, der ausschließlich nicht-differenzierende IZ enthielt, noch traten Klone auf, die nur einen differenzierten Zelltyp enthielten (Tab.2-4). Diese Ergebnisse bestätigen an einer großen Zahl von Klonen frühere Befunde von David und Murphy (1977). Die Ergebnisse zeigen ferner, daß aus solchen Klonen entweder männliche oder weibliche Gameten hervorgehen können (Tab.5). 87 von 92 untersuchten Klonen differenzierten Nervenzellen, Nematocyten und Gameten. Die Ergebnisse erlauben daher den Schluß, daß H.magnipapillata multipotente Stammzellen enthält, die sowohl zu somatischen Zellen wie auch zu Gameten differenzieren können.

Die Annahme, daß die analysierten Klone Abkömmlinge einer einzigen Stammzelle sind, beruht auf Poisson-Statistik. In Tab.6 sind die Ergebnisse unserer Klonierungsexperimente entsprechend der Anzahl CFU/Aggregat in verschiedenen Klassen aufgelistet. In Klassen mit wenig eingesetzten CFU/Aggregat stammen die untersuchten Klone mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer einzigen Stammzelle ab. Zum Beispiel: in der Klasse 0.2-0.3 CFU/Aggregat enthalten 26% der Aggregate Klone. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Klon dieser Klasse von 2 oder mehr Stammzellen abstammt, ist 0.037. Das bedeutet, 14.2% aller Klone dieser Klasse gehen statistisch auf 2 oder mehr Stammzellen zurück, während die verbleibenden 85.8% statistisch von einer einzigen Stammzelle abstammen. In dieser Klasse differenzierten 18 von 19 Klonen Gameten. Nach Poisson-Statistik gehen 2.7 Klone dabei auf 2 und mehr Stammzellen zurück, während 16.3 von einer einzigen Stammzelle abstammen. Da 18 von 19 Klonen sowohl somatische Zellen wie Gameten differenzierten, kann man schließen, daß einzelne Stammzellen von Hydra magnipapillata in der Lage sind, sowohl

Tab.6. ANALYSE DER KLONE NACH POISSON STATISTIK.

| KALKULIERTE<br>CFU/AGGR. <sup>1</sup> | ZAHL DER KLONE |         | ERWARTETE HÄUFIGKEIT <sup>2</sup> |      |      |                        | ERWARTETE ANZAHL FÜR<br>$N(\geq 2) = [P(\geq 2)/1-P(0)] \times n$ |
|---------------------------------------|----------------|---------|-----------------------------------|------|------|------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|                                       | GESAMT<br>n    | SEXUELL | P(0)                              | P(1) | P(2) | $[P(\geq 2)]/[1-P(0)]$ |                                                                   |
| 0-0.1                                 | 2              | 2       | .905                              | .090 | .005 | .053                   | 0.106                                                             |
| 0.1-0.2                               | 15             | 13      | .819                              | .164 | .016 | .099                   | 1.48                                                              |
| 0.2-0.3                               | 19             | 18      | .740                              | .222 | .037 | .142                   | 2.69                                                              |
| 0.3-0.4                               | 12             | 11      | .670                              | .268 | .062 | .188                   | 2.26                                                              |
| 0.4-0.5                               | 15             | 15      | .607                              | .303 | .090 | .229                   | 3.43                                                              |
| 0.5-1.0                               | 29             | 28      | .368                              | .368 | .264 | .418                   | 12.1                                                              |

<sup>1</sup> Ermittelt aus P(0) am Tag 13.<sup>2</sup> Kalkuliert nach der Poisson-Gleichung  $P(x) = n^x e^{-n} / x!$ .

somatische Zellen wie auch Keimbahn-Zellen zu differenzieren. Die Schlußfolgerung, daß Gameten-differenzierende Klone nicht auf "Doppeltreffer" einer mutmaßlichen Keimbahn-Stammzelle und einer somatischen Stammzelle zurückgehen, wird auch durch die in Tab.2-4 vorgestellten Befunde unterstützt: kein einziges Aggregat enthielt ausschließlich IZ (d.h. mutmaßliche Keimbahn-Stammzellen). Gäbe es Keimbahn-beschränkte Stammzellen, müssten Klone auftreten, die keine somatischen Zellen differenzieren. Unter 685 untersuchten Aggregaten, die IZ enthielten, enthielten jedoch alle Aggregate auch Nematoblasten und Nervenzellen.

5 von 92 Klonen konnten nicht zur Gametendifferenzierung induziert werden (Tab.5). Dies kann bedeuten, daß diese 5 Klone ausschließlich somatische Zellen differenzieren. Eine andere Interpretation allerdings ist, daß die Induktionsbedingungen nicht effizient genug sind. Im allgemeinen scheint die Sexualphase bei Hydra durch verschlechterte Umweltbedingungen ("environmental stress") ausgelöst zu werden (Burnett und Diehl, 1964; Park et al., 1965). Die exakten physiko-chemischen Bedingungen zur Auslösung der Sexualphase bei den meisten

Hydra-Arten (einschließlich H.magnipapillata) sind allerdings unbekannt. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Induktionseffizienz unter Laborbedingungen variiert und zu einigen wenigen Klonen führen kann, die bislang nicht zur Gametendifferenzierung induzierbar sind. Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung, daß einige Klone erst mehrere Monate nach Beginn der Induktion zur Gametenbildung gebracht werden konnten.

Die Klonierungseffizienz der Stammzellen, d.h. die Anzahl der CFU pro eingesetzte IZ, war in den hier beschriebenen Experimenten 3-5 mal niedriger als die in früheren Klonierungsexperimenten (David und Murphy, 1977; Heimfeld und Bode, 1984b). Die niedrige Klonierungseffizienz scheint ihre Ursache in Zellverlusten während der Klonierungsprozedur zu haben: Die Verwendung von H.magnipapillata Gewebe führte im Verlauf der Standard-Reaggregationsprozedur (Gierer et al., 1972) zu so beträchtlichen Zellverlusten, daß regenerierende Aggregate nur hergestellt werden konnten, wenn sf-1 Wirtszellen mit der schonenderen "Sieb-Technik" präpariert wurden. Da die Spender-Zell-Suspension weiterhin mit der üblichen "Pipettiermethode" hergestellt werden mußte, um eine Einzelzellsuspension zu erzielen, ist es daher nicht überraschend, wenn diese Zellen eine niedrige Klonierungseffizienz aufweisen.

Multipotente Stammzellen ähnlich denen von H.magnipapillata wurden auch bei H.oligactis gefunden (Tab.1 in Littlefield, 1985). Littlefield erreichte Klonierungsbedingungen durch gezielte Inaktivierung der Stammzellen mit Hydroxy-Harnstoff bis zu einem Maße, in dem statistisch einzelne Polypen nur eine überlebende Stammzelle enthielten. Nach der Hydroxy-Harnstoff Behandlung werden die meisten Tiere zu "non-feeder", da ihnen die zu Nematocyten und Nervenzellen ausdifferenzierenden Stammzellen fehlen. Einige Tiere jedoch werden zu "self-feeder". Aus dem Anteil von "non-feeder" zu "self-feeder" kann man nach Poisson Statistik schließen, daß die IZ der "self-feeder" auf eine einzelne Stammzelle zurückgehen. In den

Experimenten von Littlefield waren alle "self-feeder" in der Lage, Gameten zu bilden. Littlefield interpretierte diese sexuellen "self-feeder" als das Ergebnis von "Doppeltreffern" einer Keimbahn-beschränkten Stammzelle und einer somatischen Stammzelle. Diese Interpretation erscheint jedoch eher unwahrscheinlich angesichts der Tatsache, daß in diesen Versuchen keine rein somatischen Stammzell-Klone (= asexuelle "self-feeder") auftraten. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß die Ergebnisse von Littlefield (1985) - in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten - die Anwesenheit einer multipotenten Stammzelle, die sowohl zu Gameten- wie auch zu somatischer Differenzierung fähig ist, demonstrieren.

### 3.2.3.2. Keine Hinweise für Stammzellen mit Keimbahn-beschränkter Differenzierungskapazität

Klonierungsexperimente bei H. oligactis (Littlefield, 1985) haben gezeigt, daß es dort eine Subpopulation von IZ gibt, die ausschließlich zu Spermien differenziert. Im Gegensatz dazu geben die Ergebnisse der hier vorgestellten Klonierungsexperimente mit H. magnipapillata keinerlei Hinweis auf die Existenz einer solchen Stammzellpopulation mit eingeschränkter Differenzierungskapazität. Gibt es eine Erklärung für diese offensichtlich widersprüchlichen Befunde?

Man könnte argumentieren, daß eine Population von Stammzellen mit beschränktem Differenzierungspotential selten ist und deshalb diese Zellgruppe mit unserem statistischen Versuchsansatz nicht entdeckbar ist. Um diese Zellen zu entdecken, analysierte ich die Zellzusammensetzung von Aggregaten, die "non-feeder" Eigenschaften gezeigt hatten. Es wurden 400 "non-feeder" untersucht, die nicht per Hand gefüttert wurden (Tab.3) und 133 "non-feeder", die über mehrere Wochen per Hand gefüttert wurden (Tab.4). In keinem dieser Aggregate wurden IZ gefunden, die nicht zu somatischen Zellen (Nematoblasten, Nervenzellen) differenzierten. Darüberhinaus

Führte die Analyse der Zellzusammensetzung einer großen Zahl von Aggregaten, die am Tag 13 mazeriert wurden, zum gleichen Ergebnis. Wenn unter mehreren hundert Klonen kein einziger Klon solche nicht-differenzierenden IZ enthält, dann müssen solche Klone - wenn sie bei H.magnipapillata überhaupt existieren - wenigstens hundertmal seltener sein als die multipotenten Stammzellen, die hier charakterisiert wurden.

Als eine alternative Erklärung für das nicht beobachtete Auftreten von Keimbahn-beschränkten Stammzellen kann angeführt werden, daß solche Zellen im hier angewandten Klonierungssystem selektiv entfernt worden sind. Die Experimente wurden mit 2 Mutantenstämmen durchgeführt; Stamm-Unterschiede könnten daher möglicherweise Überleben, Proliferation und/oder Differenzierung bestimmter Stammzellpopulationen verhindert haben. Um zu überprüfen, ob Spender-Stammzellen überleben, wenn sie für längere Zeit mit allen Zellen des Wirtsgewebes konfrontiert sind, wurde eine Reihe von Klonen für 3 Wochen bei der permissiven Temperatur (18°C) kultiviert, anschließend die Wirts-IZ eliminiert und die Anzahl der vorhandenen Spender-IZ bestimmt. Es zeigte sich, daß auch in diesen Klonen eine große Zahl von Spender-IZ vorhanden war (Tab.1). Es gibt somit keinen Grund zur Annahme, daß Überleben und Wachstum der IZ des Spenderstammes von der Anwesenheit der Wirtszellen beeinflusst ist. Stamm-Unterschiede zwischen Wirt und Spender scheinen daher im hier beschriebenen Versuchssystem keine bedeutende Rolle zu spielen.

Schließlich, ist es möglich, daß Keimbahn-beschränkte Stammzellen während der 24°C-Kultur selektiv elimiert worden sind? Bei H.oligactis jedenfalls gibt es Hinweise, daß Keimbahn-beschränkte Zellen bei erhöhter Temperatur (24°C) eliminiert werden (Littlefield, pers. Mitteilung). Diese Möglichkeit scheint bei H.magnipapillata eher unwahrscheinlich zu sein, da nach Dissoziation und Reaggregation von Polypen des Spenderstammes und nachfolgender 4-wöchiger Kultur bei 24°C alle Polypen zur Gametendifferenzierung induziert werden konnten. Ferner haben Temperatur-Änderungen bei

H.magnipapillata keinen Einfluß auf die Anzahl der IZ pro Polyp.

Um zusammenzufassen: Aus den genannten Gründen erscheint es unwahrscheinlich, daß H.magnipapillata Keimbahn-beschränkte Stammzellen besitzt. Die Keimbahn scheint hier in der multipotenten Stammzell-Linie zu liegen, die sowohl zu somatischen wie auch zu Gameten differenzieren kann. Die Tatsache, daß H.oligactis ebenfalls diese multipotenten Stammzellen besitzt, läßt die Frage der Bedeutung einer Keimbahn-beschränkten Stammzelle (die bei H.oligactis in der Tat gefunden wurde, Littlefield, 1985) aufkommen. Im Augenblick jedenfalls ist es nicht möglich, die Rolle dieser Subpopulation von IZ im Sexualzyklus von Hydra zu klären.

### 3.2.3.2. Implikationen einer multipotenten Stammzelle bei Coelenteraten

In der vorliegenden Arbeit habe ich gezeigt, daß Hydren multipotente Stammzellen enthalten, die sowohl zu somatischen Zellen wie auch zu Gameten differenzieren können. Ich konnte bei der hier untersuchten Art H.magnipapillata keinen Hinweis für die Existenz einer Keimbahn-begrenzten Stammzellpopulation finden. Diese experimentellen Befunde unterstützen die allgemeine Beobachtung von Buss und Green (1986), daß asexuelle Proliferation durch Knospung ("ramet formation") nur möglich ist bei Anwesenheit einer aktiv sich teilenden, multipotenten Stammzelle, die sowohl zu somatischer wie auch zu Keimbahn-Differenzierung in der Lage ist. In keiner zur asexuellen Proliferation, und damit zu klonalem Wachstum fähigen Invertebraten Gruppe kann nach Buss und Green die Abgrenzung ("sequestration") einer Gruppe von Keimbahn-beschränkten Stammzellen entwickelt worden sein. Demnach wird erwartet, daß kolonial lebende Organismen wie Hydra und andere Coelenteraten ihre Keimzellen aus einem Pool von multipotenten Stammzellen bilden. Die Experimente der

vorliegenden Arbeit liefern nun einen direkten Hinweis für die Existenz dieser Zellen bei Hydra.

Eine weitere Implikation der Anwesenheit von multipotenten Stammzellen in diesen Tieren ist die Bedrohung durch "somatic cell parasitism" (Buss, 1982). Die Anwesenheit von multipotenten Stammzellen, die sowohl zu Soma- und Keimbahn-Differenzierung (siehe oben) wie auch zu rascher Ausbreitung durch das Gewebe fähig sind (Heimfeld und Bode, 1984a), kann unter bestimmten Voraussetzungen eine Gefahr darstellen. Zum Beispiel: Organismen, die unter natürlichen Bedingungen häufig Gelegenheit zur Gewebefusion oder zu Zell-Zell-Kontakten haben, könnten Stammzellen austauschen: wenn nun die Stammzelle eines bestimmten Stammes Gameten effizienter produziert als die des anderen Stammes, dann könnte der eine den anderen Stamm parasitieren. Angesichts dieser potentiellen Bedrohung postulierte Buss (1983), daß Organismen, die sowohl Gelegenheit zur Gewebefusion oder zu Zell-Zell-Kontakten haben wie auch multipotente Stammzellen besitzen, die Fähigkeit entwickelt haben müssen, fremde Zellen zu erkennen und gegebenenfalls zu eliminieren. Nach dieser Hypothese ist der Schutz vor eindringenden fremden Zellen die treibende Kraft für die Entwicklung von Histokompatibilitätsreaktionen gewesen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurden Histokompatibilitätsreaktionen bei 2 verschiedenen Hydrozoen-Gruppen gefunden. Bei der marinen Gattung Hydractinia konnte gezeigt werden, daß fremdes Gewebe durch Nematocysten-Beschuß zerstört wird (Buss et al., 1984). Beim Süßwasser Coelenteraten Hydra konnte gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.1), daß Epithelzellen fremde Zellen erkennen und per Phagozytose eliminieren können (Bosch und David, 1986a). Zusammen mit den in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnissen unterstützen diese Befunde daher die Hypothese von Buss, daß der Gefahr des "somatic cell parasitism" durch multipotente Stammzellen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Beibehaltung von Histokompatibilitätsreaktionen bei Invertebraten zukommt.

### 3.3. REKLONIERUNG VON STAMMZELLEN AUS MÄNNLICHEN UND WEIBLICHEN KLONEN: Die zelluläre Grundlage der Geschlechtsbestimmung bei Hydra.

#### 3.3.1. EINFÜHRUNG

Ein überraschender Befund der im vorangegangenen Abschnitt (3.2.) beschriebenen Klonierungsexperimente war die Tatsache, daß die meisten Stammzell-Klone (etwa 70%) weibliche Gameten differenzierten, obwohl sie männlichen Polypen entnommen wurden (Tab.5. in 3.2.2.6.).

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von männlichen und weiblichen Klonen ist, daß individuelle Stammzellen zu männlichen wie zu weiblichen Gameten differenzieren können. Eine andere Möglichkeit ist, daß Stammzellen in ihrer geschlechtlichen Differenzierungsfähigkeit eingeschränkt sind und die Polypen (in diesem Fall männliche Polypen) daher sowohl männliche wie auch weibliche Stammzellen enthalten. In diesen männlichen Polypen werden die weiblichen Stammzellen daran gehindert, Eier zu differenzieren (Sugiyama und Fuijsawa, 1985); erst in Abwesenheit männlicher Stammzellen, z.B. unter Klonierungsbedingungen, können die weiblichen Stammzellen weibliche Gameten differenzieren.

Um nun zu untersuchen, welche dieser beiden Möglichkeiten zutrifft, reklonierte ich Stammzellen von Polypen, die männliche oder weibliche Stammzellklone enthielten. Wenn Stammzellen zu Gameten beiderlei Geschlechts ausdifferenzieren können, werden unabhängig vom Geschlecht des Spender-Klones - Klone beiderlei Geschlechts erwartet. Wenn dagegen die Stammzellen in der Gametendifferenzierung auf ein Geschlecht festgelegt sind, dann sollten im Reklonierungsexperiment die Klone ausschließlich vom Geschlecht des Spender-Klones sein.

Die Ergebnisse zeigen, daß weibliche Stammzellen in ihrer geschlechtlichen Differenzierungsleistung eingeschränkt sind: Weibliche Klone, wenn rekloniert, enthalten ausschließlich

weibliche Stammzellen. Männliche Klone dagegen, wenn rekloniert, enthalten sowohl männliche wie weibliche Stammzellen. Männliche Stammzellen sind daher zur Änderung ihres geschlechtlichen Differenzierungsweges, d.h. zum "sex switch" (siehe 2.11), fähig.

Diese Befunde zusammen mit den Ergebnissen von anderen Untersuchungen erlauben es, ein Modell zu erstellen, indem der sexuelle Phänotyp von Hydra einmal durch das Geschlecht der Stammzellen und zum anderen durch Zell-Zell-Interaktionen zwischen männlichen und weiblichen Stammzellen kontrolliert wird (Bosch und David, 1986c). Geschlechtsumkehr von Polypen rührt nach diesem Modell vom "sex switch" einzelner Stammzellen her.

### 3.2.2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER REKLONIERUNGSEXPERIMENTE

Als Spender-Klone dienten Stammzell-Klone aus männlichen Polypen von Mutante ms-1. Die Klone wurde in dem in Abschnitt 3.2.2.6. beschriebenen Versuchsansatz erhalten. Die regenerierenden Aggregate wurden klonal vermehrt und differenzierten männliche oder weibliche Gameten (vgl. Tab.5, 3.2.2.6.). Die verwendeten Klone sind in Tab.7 aufgeführt. Jeder Klon stammt mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit (vgl.Tab.6, 3.2.3.1.) von einer einzelnen Stammzelle ab.

Tab.7. SPENDER-KLONE FÜR DIE REKLONIERUNGSEXPERIMENTE.

| KLON<br>CODE | GESCHLECHT DES<br>SPENDER-KLON | ALTER DES SPENDER<br>KLONES (TAGE) <sup>1</sup> |
|--------------|--------------------------------|-------------------------------------------------|
| 1            | ♀                              | 247                                             |
| 1            | ♀                              | 210                                             |
| 2            | ♂                              | 181                                             |
| 3            | ♂                              | 261                                             |
| 4            | ♂                              | 161                                             |

<sup>1</sup> Tage zwischen Herstellung des Klon und Verwendung als Spender-Klon.

Die Ergebnisse der Reklonierungsexperimente sind in Tab.8 gezeigt. Stammzellen, die weiblichen Klonen entnommen wurden, differenzierten ausschließlich weibliche Gameten. Selbst in Klassen, die statistisch mehr als eine CFU/Aggregat erhalten hatten, konnte in keinem Fall die Differenzierung männlicher

Tab.8. SEXUELLE DIFFERENZIERUNG DER STAMMZELLEN AUS MÄNNLICHEN UND WEIBLICHEN KLONEN.

| GESCHLECHT DES SPENDER-KLONES | TAGE ZWISCHEN HERSTELLUNG DES KLONES UND REKLONIERUNG | KALKULIERTE CFU/AGGR. <sup>1</sup> | ♂                 | ♀    | ♀ <sup>2</sup> |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------|------|----------------|
| ♀                             | 229 (± 27)                                            | 0-0.1                              | -                 | 1    | -              |
|                               |                                                       | 0.1-0.2                            | -                 | 3    | -              |
|                               |                                                       | 0.2-0.3                            | -                 | -    | -              |
|                               |                                                       | 0.3-0.4                            | -                 | 9    | -              |
|                               |                                                       | 0.4-0.5                            | -                 | -    | -              |
|                               |                                                       | 0.5-1.0                            | -                 | 8    | -              |
|                               |                                                       | Σ1.0                               | -                 | 19   | -              |
|                               |                                                       | GESAMT                             | -                 | 40   | -              |
| ♂                             | 205 (± 6)                                             | 0-0.1                              | -                 | -    | -              |
|                               |                                                       | 0.1-0.2                            | 2                 | 2    | -              |
|                               |                                                       | 0.2-0.3                            | 2                 | -    | -              |
|                               |                                                       | 0.3-0.4                            | 2                 | 2    | 1              |
|                               |                                                       | 0.4-0.5                            | -                 | -    | -              |
|                               |                                                       | 0.5-1.0                            | 4                 | 1    | -              |
|                               |                                                       | Σ1.0                               | N.D. <sup>3</sup> | N.D. | N.D.           |
|                               |                                                       | GESAMT                             | 10                | 5    | 1              |
| ♂                             | Massenkultur von Stamm ms-1 <sup>3</sup>              | 0-0.5                              | 13                | 42   | 4              |
|                               |                                                       | 0.5-1.0                            | 10                | 16   | 2              |
|                               |                                                       |                                    |                   |      |                |

<sup>1</sup> Kalkuliert nach Poisson Statistik aus dem "non-feeder"/"self-feeder" Verhältnis.

<sup>2</sup> In diesen Klonen, die aus mehreren (5-10) Polypen bestanden (siehe Text), entstanden während des etwa einjährigen Beobachtungszeitraumes in unregelmäßigen Abständen sowohl männliche wie weibliche Polypen.

<sup>3</sup> Ergebnisse aus Tab.5, Abschnitt 3.2.2.6.

\* N.D. = nicht untersucht.

Gameten beobachtet werden. Diese Befunde zeigen, daß weibliche Stammzellen von H.magnipapillata in ihrer geschlechtlichen Differenzierungskapazität beschränkt sind.

Stammzellen aus männlichen Spender-Klonen differenzierten in den meisten Fällen männliche Gameten (Tab.8). In 5 Fällen differenzierten diese Stammzellen Eier. Ein Klon differenzierte Spermien und Eier.

Bei diesen Versuchen zeigten die Stammzellen aus 3 verschiedenen männlichen Spender-Klonen (Tab.1) dasselbe Differenzierungsverhalten. Zum Vergleich sind in Tab.8 auch die Klonierungsergebnisse von Stammzellen männlicher Polypen aus der Massenkultur (= Ergebnisse aus Tab.5, 3.2.2.6.) aufgeführt. Diese Klone differenzierten zu einem beträchtlich höheren Anteil weibliche Gameten (siehe unten).

### 3.3.2.1. "Sex Switch" der Stammzellen

Die Ergebnisse der Reklonierungsexperimente (Tab.8) zeigen, daß Stammzellen aus "männlichen" Klonen Klone bilden, die in einigen Fällen zu männlichen und in anderen zu weiblichen Gameten differenzieren. Das gleichzeitige Auftreten von weiblichen und männlichen Klonen wird als das Ergebnis eines "sex switch" (siehe 2.11) interpretiert, der sich in einer männlichen Stammzelle während der Proliferation des ursprünglichen Klones ereignet hat. Der Anteil von männlichen zu weiblichen Klonen war im Reklonierungsexperiment etwa 2:1 (Tab.8). Wenn mit einer Häufigkeit von etwa 1% pro Zelle pro Generation ein "sex switch" männlicher Stammzellen stattfindet, dann werden Klone, die von einzelnen männlichen Zellen abstammen, nach 50-100 Stammzell-Generationen etwa 30% weibliche Stammzellen enthalten. Diese Annahme stimmt mit den experimentellen Befunden überein, da die Spender-Klone für etwa 200 Tage kultiviert wurden und die Generationszeit von Stammzellen etwa 1-2 Tage ist (David und Murphy, 1977).

Wie im folgenden angeführt, wurde ein "sex switch" weiblicher Stammzellen niemals beobachtet. Der Anteil der weiblichen Zellen in einem männlichen Klon muß daher im Lauf der Zeit stetig zunehmen. Und in der Tat, ein solch langsamer Anstieg ist zu beobachten, wenn man die Reklonierungsergebnisse (200 Tage alte Klone) mit den Ergebnisse von Tieren vergleicht, die einer Massenkultur des männlichen Stammes entnommen wurden. Die Stammzellpopulationen in solchen Kulturen haben für längere

Zeit proliferiert als die Klone in den Reklonierungs- experimenten und in Übereinstimmung mit obiger Annahme hat der Anteil der weiblichen Zellen drastisch zugenommen (Tab.8). Eine stete Zunahme von weiblichen Zellen erscheint langfristig allerdings unstabil zu sein und letztlich zu Polypen mit ausschließlich weiblichen Stammzellen zu führen. Da dies in natürlichen Populationen ganz offensichtlich nicht der Fall ist, scheinen entweder männliche Stammzellen einen geringen Wachstumsvorteil gegenüber weiblichen Stammzellen zu haben oder ein "sex switch" in weiblichen Stammzellen tatsächlich - mit sehr geringer Häufigkeit - zu erfolgen.

### 3.3.2.2. Suppression weiblicher Differenzierung durch männliche Keimzellen.

Die Reklonierungsergebnisse in Tab.8 zeigen, daß männliche Klone sowohl männliche wie weibliche Stammzellen enthalten. Dieser Befund stimmt gut mit den früheren Klonierungsergebnissen (Abschn.3.2.2.6.) an männlichen Polypen überein, in denen männliche und weibliche Klonen beobachtet werden konnten. In vivo Beobachtungen von Tardent (1966) stimmen ebenfalls mit dem hier beschriebenen Befund einer Mischpopulation von männlichen und weiblichen Stammzellen in einzelnen männlichen Polypen überein. Bestrahlung von männlichen H.attenuata Polypen mit einer Röntgendosis, die ausreichte, die meisten IZ zu eliminieren, führte unter den Polypen, die die Behandlung überlebten, zum Auftreten von 70-90% Weibchen. Tardent nimmt an, daß der männliche Teil der IZ-Population - der demnach deutlich kleiner zu sein scheint als der weibliche Teil - durch die Behandlung eliminiert worden ist.

Die Anwesenheit von weiblichen Stammzellen in männlichen Polypen, die in diesen an der Differenzierung weiblicher Gameten gehindert werden, deutet an, daß männliche Stammzellen

die Differenzierungsfähigkeit weiblicher Stammzellen unterdrücken. Diese Unterdrückung erklärt die klassische Beobachtung von "Maskulinisierung" weiblicher Polypen nach Transplantation auf männliches Gewebe (Ref. in Littlefield, 1985). Ein besonders elegantes Experiment dieser Art wurde kürzlich bei H.magnipapillata von Sugiyama und Sugimoto (1985) durchgeführt. Diese Autoren stellten heterosexuelle Chimären her, indem sie einen weiblichen Stamm mit einer somatischen Mutation im Nematozyten-Differenzierungsweg auf einen männlichen Stamm mit einer Mutation in der Spermien-Differenzierung transplantierten. Die Autoren fanden, daß während 4-monatiger Parabiose sowohl die weiblichen wie auch die männlichen Stammzellen proliferierten und auch somatische Zellen differenzierten (erkennbar als eine Mischung von Wildtyp- und Mutanten Nematozyten in den Tentakeln der Chimären). Nur die männlichen IZ jedoch differenzierten Gameten: Alle analysierten Spermien waren mutiert; die weiblichen IZ differenzierten keine Gameten.

Die beobachtete Suppression der weiblichen Differenzierung durch männliche Stammzellen legt nahe, daß weibliche Polypen keine männlichen Stammzellen enthalten. Die Ergebnisse der Klonierungsexperimente (Tab.8) bestätigen diese Erwartung: Aus Stammzellen weiblicher Klone entstehen ausschließlich Klone, die weibliche Gameten differenzieren.

### 3.3.2.3. Geschlechtsbestimmung und Geschlechtsumkehr bei Hydra Polypen und ihr Zusammenhang zur Anwesenheit von männlichen und weiblichen Stammzellen.

Bei den meisten Metazoen wird der sexuelle Phänotyp durch das somatische Gewebe oder durch Umweltfaktoren determiniert: Werden Keimzellen in einen Embryo des anderen Geschlechts transplantiert, entwickeln sich diese (manchmal allerdings unvollkommen) entsprechend dem Geschlecht der neuen Umgebung und nicht entsprechend dem ihres eigenen Karyotyps (zur

Übersicht siehe McCarrey und Abbott, 1979). Hydra ist in dieser Hinsicht ungewöhnlich, da hier der sexuelle Phänotyp ausschließlich durch die IZ-Linie, aus der auch die Gameten hervorgehen, festgelegt wird; das Epithel scheint ohne Einfluß auf die Geschlechtsbestimmung zu sein (Littlefield, 1984; Campbell, 1985). Ein weiteres ungewöhnliches Merkmal von Hydra ist das Auftreten von spontaner Geschlechtsumkehr bei erwachsenen Polypen. Während bei "labil gonochoristischen" Arten (H.attenuata, H.carnea, H.magnipapillata) spontane Geschlechtsumkehr der Polypen eher als häufig beschrieben wird (Tardent, 1985), kommen in "stabil gonochoristischen" Arten (H.oligactis) nur sehr vereinzelt Fälle spontaner Geschlechtsumkehr vor. Einige wenige Arten sind Simultan-Hermaphroditen (H.viridis, H.circumcincta).

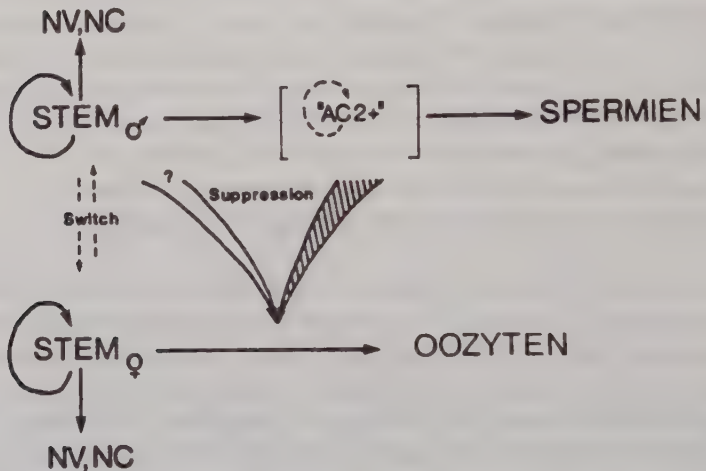
Obwohl die zelluläre Grundlage der Geschlechtsumkehr nicht verstanden ist, kann sie experimentell induziert werden, indem man männliches Gewebe auf weibliches Gewebe transplantiert. In solchen heterosexuellen Transplantaten wird stets eine Geschlechtsumkehr der Weibchen zu Männchen beobachtet. Die "maskulinisierten" Weibchen verhalten sich als stabile Männchen. Die Maskulinisierung wird durch die Wanderung männlicher IZ in weibliches Gewebe verursacht (Sugiyama und Fuijsawa, 1985) und zeigt, daß männliche IZ die Differenzierung weiblicher Gameten unterdrücken.

Auf der Grundlage der hier vorgestellten Ergebnisse sowie früherer Beobachtungen ist es nun möglich, ein Modell zur Kontrolle der Geschlechtsbestimmung bei Hydra Polypen zu konstruieren. Das Modell ist schematisch in Fig.20 dargestellt und beruht auf folgenden experimentellen Befunden:

(1) Stammzellen oder ihre Abkömmlinge bestimmen das Geschlecht der Polypen; Zellen des Epithel haben keinen Einfluß auf die Art des sexuellen Phänotyps (Littlefield, 1984; Campbell, 1985).

(2) Stammzellen sind beschränkt auf männliche oder weibliche

Differenzierung. Stammzellen, aus Hydra-Gewebe geklont, gründen Klone, die somatische Abkömmlinge (Nervenzellen und Nematocyten) und männliche oder weibliche Gameten differenzieren (Tab.5 in 3.2.2.6.).



**Fig.20.** Modell zur Kontrolle der Geschlechtsbestimmung bei Hydra, das die Interaktionen zwischen männlichen und weiblichen Stammzellen darstellt. NV = Nervenzellen, NC = Nematocyten, STEM = Stammzellen. "AC2+" Zellen wurden von Littlefield (1985) definiert und sind im Text erläutert.

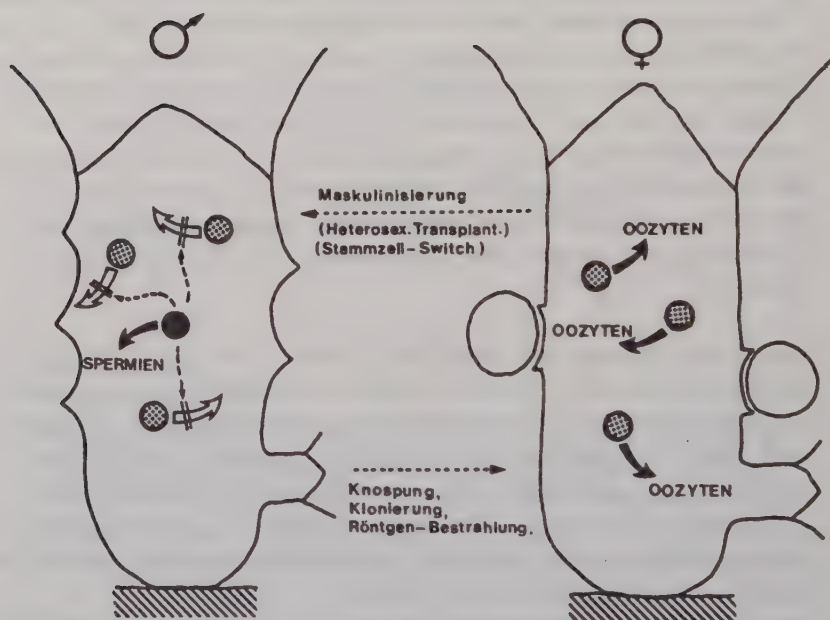
(3) Männliche Stammzellen sind mit einer geringen Häufigkeit zum "sex switch" fähig (Tab.8). Weibliche Stammzellen, wenigstens bei H.magnipapillata, zeigen keinen "sex switch". Bei H.attenuata dagegen gibt es indirekte Hinweise, daß weibliche Stammzellen gelegentlich zur Differenzierung männlicher Gameten wechseln (siehe unten).

(4) Männliche Stammzellen und/oder frühe Vorstufen im Spermatogonien-Differenzierungsweg unterdrücken die Differenzierung weiblicher Stammzellen. Dieser Einfluß kann am deutlichsten als "Maskulinisierung" nach Transplantation von männlichem Gewebe auf weibliches Gewebe gesehen werden (Ref. in Littlefield, 1985). Die Anzahl der männlichen Stammzellen, die für eine effektive Suppression notwendig sind, scheint niedrig zu sein.

Mit Hilfe des Modells ist es nun möglich, die Stammzell-Zusammensetzung und den sexuellen Phänotyp von Hydra Polypen vorhersagen. Weibliche Polypen enthalten nur weibliche Stammzellen, da die Anwesenheit von männlichen Stammzellen die Differenzierung von weiblichen Gameten verhindert. Männliche Polypen enthalten - aufgrund von "sex switch" während der Proliferation der männlichen Stammzellen - eine Mischpopulation aus männlichen und weiblichen Stammzellen. "Sex switch" weiblicher Stammzellen scheint es bei H.magnipapillata und H.oligactis nicht und bei H.attenuata eher selten zu geben (Tab.9).

Wie Fig.21 schematisch darstellt, führen bei Hydra-Polypen - je nach Richtung des Wechsels - zwei verschiedene Mechanismen zur Geschlechtsumkehr: (1) Geschlechtsumkehr weiblicher Polypen wird durch Einführung von männlichen Stammzellen verursacht. Dies erfolgt, wenn männliches Gewebe auf weibliches Gewebe transplantiert wird ( = "Maskulinisierung" in heterosexuellen Transplantaten) oder wenn eine weibliche Stammzelle durch "sex switch" zu einer männlichen Stammzelle wird. (2) Geschlechtsumkehr männlicher Polypen wird durch alle Vorgänge, die männliche von weiblichen Stammzellen trennen, herbeigeführt. Dies geschieht bei Stammzell-Klonierungsexperimenten oder als Ergebnis von Röntgen-Bestrahlungsexperimenten in Fällen, wo weibliche Stammzellen weit häufiger als männliche Stammzellen sind (infolge relativ häufigem "sex switch" der männlichen Stammzellen während der Proliferation). Schließlich kann Geschlechtsumkehr von männlichen Polypen, die nur einige wenige männliche Stammzellen enthalten, auch durch

Knospung verursacht werden: Stammzellen wachsen in einer klonalen Anordnung und sind deshalb nicht gleichförmig im Polypen verteilt (Fig.17 und Fig.19, 3.2.2.4.). Knospungsbildung führt daher gelegentlich zu Polypen, die keine männlichen Stammzellen mehr enthalten. Solche Polypen sind Weibchen.



**Fig.21.** Stammzellen, sexueller Phänotyp und Geschlechtsumkehr bei *Hydra*. Männliche Polypen enthalten männliche (●) und weibliche (⊗) Stammzellen; weibliche Polypen enthalten ausschließlich weibliche (⊗) Stammzellen. Schwarze Pfeile deuten die Gametendifferenzierung, unterbrochene Pfeile die Suppression weiblicher Differenzierung durch männliche Stammzellen an.

Verschiedene Arten von Hydra wechseln unterschiedlich häufig das Geschlecht und zeigen alle Grade des Zwittertums - von stabil gonochoristisch bis simultan-hermaphroditisch (Tab.9; Übersicht in Tardent, 1985). Diese Unterschiede können entsprechend dem vorgestellten Modell nun durch Unterschiede in der Häufigkeit, mit der Stammzellen den geschlechtlichen Differenzierungsweg ändern, erklärt werden:

Bei H.magnipapillata werden männliche Stammzellen mit einer Häufigkeit von  $10^{-2}$  pro Zelle pro Generation zu weiblichen Stammzellen (Tab.8). Bei weiblichen Stammzellen wurde niemals ein Wechsel der geschlechtlichen Differenzierungspotenz beobachtet. Als Ergebnis dieser unterschiedlichen "switching"-Häufigkeit nimmt der Anteil der männlichen Stammzellen im Verlauf der Proliferation einer männlichen Population stetig ab. Männliche Polypen einer Massenkultur enthalten im Durchschnitt etwa 30% männliche Zellen (Tab.5, 3.2.2.6.); dabei können einige Polypen durchaus deutlich weniger männliche Stammzellen enthalten haben. Als Folge der räumlichen Lokalisierung der Stammzell-Klone (Fig.17 und Fig.19 in 3.2.2.4.) können aus solchen männlichen Polypen Weibchen werden, wenn Knospen gebildet werden, die ausschließlich weibliche Zellen enthalten. Die durchaus seltene Beobachtung von weiblichen Polypen in männlichen Massenkulturen von H.magnipapillata (eigene Beobachtung; Sugiyama, pers.Mitteilung) ist wahrscheinlich als Ergebnis eines solchen Ereignisses anzusehen. Die beobachtete Stabilität der weiblichen Polypen von H.magnipapillata stimmt mit dem Befund überein, daß kein "sex switch" weiblicher Stammzellen beobachtet werden konnte (Tab.8).

In labil gonochoristischen Arten wie H.attenuata sind die weiblichen Polypen eher instabil und wechseln relativ häufig zum männlichen Geschlecht (Brien und Reniers-Decoen, 1951; Tardent, 1966). Da auch hier das "Maskulinisierungs-Phänomen" beobachtet wird (Tab.9), scheint es wahrscheinlich, daß weibliche Polypen von H.attenuata nur weibliche Stammzellen

Tab. 9. GESCHLECHTSBESTIMMUNG BEI HYDRA.

| HYDRA<br>ARTEN                        | GESCHLECHT DER<br>STAMMZELLEN<br>IN ♀ POLYPEN | GESCHLECHT DER<br>STAMMZELLEN<br>IN ♂ POLYPEN | MASKULINISIERUNG IN<br>HETEROSEXUELLEN<br>TRANSPLANTATEN | GESCHLECHTSUMKEHR<br>IN POLYPEN | RATE DES "SEX SWITCH"<br>IN STAMMZELLEN<br>(switch/zelle/generation) |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|                                       |                                               |                                               |                                                          | ♂-♀   ♀-♂                       | ♂-♀   ♀-♂                                                            |
| <u>olidactis</u>                      | [ ♀ ]                                         | Überwiegend ♂ (1)                             | +                                                        | (1)                             | -   [niedrig]   N.D.                                                 |
| <u>magnipapillata</u>                 | ♀ (2)                                         | 70% ♀, 30% ♂ (2)                              | +                                                        | (3)                             | selten (4)<br>(5)                                                    |
| <u>attenuata</u>                      | [ ♀ ]                                         | Überwiegend ♀<br>(90% ♀, 10% ♂) (8)           | +                                                        | (7)                             | +                                                                    |
| <u>circumcincta</u><br><u>viridis</u> | ( ♂ / ♀ )                                     |                                               | Simultan-Hermaphroditen!                                 |                                 |                                                                      |
|                                       |                                               |                                               |                                                          |                                 | N.D.   N.D.                                                          |

[ ] = Indirekte Schlußfolgerungen aus anderen Ergebnisse der Tabelle.

N.D. = Nicht untersucht.

(1) Littlefield, 1985.

(2) Siehe Tab. 8.

(3) Sugiyama und Sugimoto, 1985.

(4) Eigene Beobachtung.

(5) Sugiyama; eigene Beobachtung.

(6) Kalkulation basiert auf den Ergebnissen in Tab. 8.

(7) Referenzen bei Littlefield, 1985.

(8) Tardent, 1966.

(9) Tardent, 1966; Brien und Reniers-Decoen, 1951.

(10) Ermittelt aus Brien und Reniers-Decoen, 1951, siehe Text.

enthalten. Wir schätzen die Häufigkeit der Geschlechtsumkehr vom Weibchen zum Männchen mit etwa  $10^{-4}$ , da weibliche Polypen etwa  $10^3$  Stammzellen enthalten (pers. Beobachtung), der Stammzell-Zyklus 1-2 Tage dauert (David und Campbell, 1974) und eine Geschlechtsumkehr einmal in 1-2 Monaten auftritt (Brien und Reniers-Decoen, 1951). Männliche Polypen von H.attenuata wechseln ebenfalls häufig das Geschlecht (Brien und Reniers-Decoen, 1951; Tardent, 1966). Solche Polypen scheinen vornehmlich weibliche Stammzellen und nur einige wenige männliche Stammzellen (etwa 10%) zu enthalten, da die Röntgenbestrahlungsexperimente von Tardent (1966) in annähernd allen männlichen Polypen eine Geschlechtsumkehr verursachen konnten. Der hohe Anteil weiblicher Zellen in männlichen H.attenuata Polypen deutet an, daß bei dieser Art der Wechsel vom Männchen zum Weibchen häufiger erfolgt als bei H.magnipapillata. In Übereinstimmung mit der niedrigen Zahl von männlichen Stammzellen steht die Beobachtung, daß männliche Polypen von H.attenuata häufiger zur Geschlechtsumkehr neigen als männliche Polypen von H.magnipapillata (Tab.9).

In "stabil gonochoristischen" Arten wie H.oligactis wurden nur sehr vereinzelt Fälle spontaner Geschlechtsumkehr beobachtet (Tardent, 1985), was auf eine relativ niedrige Häufigkeit der Geschlechtsumkehr der Stammzellen schließen läßt. In Übereinstimmung mit dieser Interpretation steht der Befund, daß in Klonierungsexperimenten männliche H.oligactis Polypen einen hohen Anteil männlicher Stammzellen aufwiesen (Tab.3 in Littlefield, 1985). Dieser Befund steht in deutlichem Gegensatz zu Beobachtungen bei männlichen Polypen von H.magnipapillata und H.attenuata, in denen die weiblichen Stammzellen überwiegen.

Simultan-hermaphroditische Arten (H.viridis, H.circumcincta) können entsprechend dem Modell am einfachsten als Polypen verstanden werden, in denen sowohl männliche wie weibliche Stammzellen anwesend sind und in denen der Faktor, der für die Suppression verantwortlich ist, abwesend ist. Beide Arten von Gameten können daher gleichzeitig differenzieren.

Experimente von Littlefield (1985) bei H. oligactis haben gezeigt, daß es eine Stammzelle mit ausgeprägter Proliferationsfähigkeit gibt, die auf den Spermatozyten-Differenzierungsweg beschränkt ist und mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers ("AC2") identifiziert werden kann. Solche Zellen scheinen aus multipotenten Stammzellen hervorzugehen, die sowohl zu somatischer wie zur Keimbahn-Differenzierung in der Lage sind (Littlefield, 1986) und können als frühe Vorstufen der Spermatozyten-Differenzierung angesehen werden (Fig.20). Darüberhinaus konnte Littlefield (1986) zeigen, daß "AC2+" Zellen für die Suppression der Differenzierung der weiblichen Gameten in männlichen Polypen verantwortlich sind.

Bei H. magnipapillata ließen sich Stammzellen, die auf den Spermatozyten-Weg beschränkt sind, nicht klonieren (siehe Abschn.3.2.3.2.). Wir haben allerdings experimentelle Hinweise, daß diese Zellen auch bei H. magnipapillata existieren: Ein monoklonaler Antikörper erkennt in asexuellen Polypen "AC2"-ähnliche Zellen (T.Schmidt, pers.Mitteilung). Ob bei H. magnipapillata alleine diese Vorstufen oder zusätzlich auch die multipotenten Stammzellen für die Suppression der Differenzierung weiblicher Gameten verantwortlich sind, ist im Augenblick unklar (Fig.20).

Es liegt nahe, das vorgestellte Modell auf die Geschlechtsbestimmung während der Embryogenese auszudehnen. Dementsprechend könnte man erwarten, daß die embryonalen Keimzellen männlich sind; weibliche Zellen würden während der Ontogenese durch Geschlechtsumkehr der männlichen Stammzellen entstehen. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, da frisch geschlüpfte Polypen ("Primärpolypen") entweder von männlichem oder von weiblichem Geschlecht sind (Tardent, 1985). Daneben gibt es Hinweise, die andeuten, daß bei H. oligactis die Geschlechtsmerkmale keine ausschließliche Angelegenheit der Stammzellen sind, sondern daß auch die Epithelzellen geschlechtsspezifische Unterschiede zeigen (Campbell, 1985).

Ein derartiger Befund läßt sich daher am ehesten mit einer genetischen Grundlage der Geschlechtsbestimmung erklären. Der in den hier beschriebenen Experimenten gefundene Geschlechtsumkehr-Mechanismus scheint daher einen alternativen Mechanismus darzustellen, der während der ausgedehnten Phasen des klonalen Wachstums zur Erzeugung beider Geschlechter führt. Es ist denkbar, daß ein derartiger, zusätzlicher Mechanismus gerade bei Organismen, die vorwiegend asexuell durch Knospenbildung proliferieren, von Vorteil ist.

Im Hinblick auf den Geschlechtsbestimmungsmechanismus scheint Hydra eine Zwischenstellung einzunehmen zwischen einzelligen Eukaryonten und höheren Metazoen. Bei höheren Metazoen (Arthropoden, Vertebraten) scheint der sexuelle Phänotyp primär vom somatischen Gewebe kontrolliert zu werden; die Keimzellen, selbst wenn sie chromosomal auf männliche oder weibliche Differenzierung vorprogrammiert sind, differenzieren entsprechend dem Geschlecht der Gonade (McCarrey und Abbott, 1979). Im Gegensatz dazu wird das Geschlecht bei dem einfachen Metazoen Hydra von der Zelllinie bestimmt, aus der auch die Gameten entstehen; zur Zeit gibt es keinen Hinweis für einen somatischen Einfluß auf die Geschlechtsbestimmung. In diesem Sinn scheint Hydra eher den einzelligen Eukaryonten wie Hefe ähnlich zu sein, bei denen das Geschlecht von der Zelle selbst bestimmt wird. Aus diesem Grund war es besonders interessant zu entdecken, daß die Stammzellen von Hydra einen Geschlechtsumkehrmechanismus haben, der analog dem bei Hefen bekannten Paarungstyp-Wechsel (für Ref. siehe Saier und Jacobsen, 1984) zu sein scheint.

Die Differenzierungsleistung der interstitiellen Stammzellen von Hydra wurde in Klonierungsexperimenten untersucht.

Die Klonierung von Stammzellen einer Art (H. oligactis) im Gewebe einer anderen Art (H. attenuata) war nicht möglich, da mit einer Reihe xenoplastischer Transplantationsexperimente gezeigt werden konnte, daß Hydra einen selbst/nicht-selbst Erkennungsmechanismus besitzt und artfremde Zellen via Phagozytose durch Epithelzellen eliminiert werden.

Die Klonierung von Stammzellen wurde daher unter Verwendung zweier Mutanten von H. magnipapillata nach einem statistischen Klonierungsverfahren durchgeführt. Alle Stammzellklone differenzierten somatische Zellen (Nervenzellen und Nematocyten). Kein Klon enthielt Stammzellen, die nicht differenzierten. Die meisten Klone konnten zur Gametendifferenzierung induziert werden. Kein Klon differenzierte ausschließlich Gameten. Die Ergebnisse zeigen, daß die Stammzellen von H. magnipapillata multipotent sind in dem Sinn, daß jede einzelne Stammzelle sowohl zu somatischen Zellen wie auch zu Keimbahnzellen differenzieren kann. Die Implikationen dieser Ergebnisse werden diskutiert.

Interstitielle Stammzell-Klone aus männlichen H. magnipapillata Polypen differenzierten männliche oder weibliche Gameten. Um die geschlechtliche Stabilität dieser Klone zu untersuchen, wurden die Stammzellen rekloniert. Die Ergebnisse zeigen, daß weibliche Klone in ihrer geschlechtlichen Differenzierungsleistung eingeschränkt sind; männliche Klone sind mit einer Häufigkeit von  $10^{-2}$  pro Zelle und Generation zur Geschlechtsumkehr fähig. Weibliche Polypen enthalten daher ausschließlich weibliche Zellen; männliche Polypen enthalten eine Mischung aus weiblichen und männlichen Zellen. Es wird schließlich ein Modell vorgestellt, in dem der geschlechtliche Phänotyp von Hydra durch (1) die "switching" Häufigkeit von männlichen und weiblichen Stammzellen und (2) die Suppression der weiblichen Zellen durch männliche Zellen kontrolliert wird.

## 5. L I T E R A T U R

Batschelet, E (1980). "Einführung in die Mathematik für Biologen". Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S.508.

Bibb, C. und R.D.Campbell (1973). Cell affinity determining heterospecific graft tolerance in hydra. Tissue Cell 5(2), 199-208.

Bode, H., S.Berking, C.N.David, A.Gierer, H.Schaller und E.Trenkner (1973). Quantitative analysis of cell types during growth and morphogenesis in hydra. Roux'Arch.Dev.Biol. 171, 269-285.

Bode, H.R. und David, C.N. (1978). Regulation of a multipotent stem cell, the interstitial cell of hydra. Progr. Biophys. Molec. Biol. 33, 189-206

Bosch, T.C.G. und David, C.N. (1984). Growth regulation in Hydra: Relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. Dev.Biol. 104, 161-171.

Bosch, T.C.G. und David, C.N. (1986a). Immunocompetence in Hydra: Epithelial cells recognize self-nonsel and react against it. J.Exp.Zool. 238, 225-234.

Bosch, T.C.G. und David, C.N. (1986b). All stem cells of Hydra magnipapillata can differentiate somatic cells and germ line cells. Dev.Biol., eingereicht.

Bosch, T.C.G. und David, C.N. (1986c). Male and female stem cells and the sex of hydra polyps. Proc.Nat.Acad.Sci., eingereicht.

Brien, P. und M.Reniers-Decoen (1951). La Gametogenese et L'intersexualite chez Hydra attenuata (Pall). Ann.Soc.R.Zool.Belg. 82, 285-380.

Buehrer, M. und P.Tardent (1980). Compatibilities and incompatibilities in Podocoryne carnea (Anthomedusae). In "Developmental and Cellular Biology of Coelenterates", Hrsg. P. und R.Tardent. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. S.477-480.

Burnett, A.L. und Diehl, N.A. (1964). The nervous system of Hydra. III. The initiation of sexuality with special reference to the nervous system. J.Exp. Zool. 157, 237-250.

Bursch, W., B.Lauer, I.Timmermann-Trosiener, G.Barthel, J.Schuppler und R.Schulte-Hermann (1984). Controlled cell death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. Carcinogenesis 5, 453-458

Buss, L.W. (1982). Somatic cell parasitism and the evolution of somatic tissue compatibility. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 5337-5341.

Buss, L.W. (1983). Evolution, development, and the units of selection. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80, 1387-1391.

Buss, L.W., C.S.McFadden und D.R.Keene (1984). Biology of hydractiniid hydroids. 2. Histocompatibility effector system/competitive mechanism mediated by nematocyst discharge. Biol.Bull.167, 139-158.

Buss, L.W., J.L.Moore und D.R.Green (1985). Autoreactivity and self-tolerance in an invertebrate. Nature 313, 400-402.

Buss, L.W. und D.R.Green (1986). Histoincompatibility in vertebrates: the relict hypothesis. J.Comp.Devel.Immunol., im Druck.

Campbell, R.D. und C.Bibb (1970) Transplantation in coelenterates. Transplant.Proc.2, 202-211.

Campbell, R.D. und David, C.N. (1974). Cell cycle kinetics and development of Hydra attenuata. J.Cell Sci. 16, 349-358.

Campbell, R.D. (1976). Elimination of Hydra interstitial and nerve cells by means of colchizine. J.Cell Sci.21, 1-13.

Campbell, R.D. (1985). Sex determination in hydra: roles of germ cells (interstitial cells) and somatic cells. J.Exp.Zool. 234, 451-458

Coombe, R.D., P.L.Ey und C.R.Jenkin, (1984). Self/non-self recognition in invertebrates. The Quaterly Review of Biology 59, 231-255.

David, C.N. und R.D.Campbell (1972). Cell cycle kinetics and development of Hydra attenuata. I.Epithelial cells. J.Cell Sci. 11:557-568.

David, C.N. (1973). A quantitative method for maceration of hydra tissue. Wilhelm Roux's Archives 171, 259-268

David, C.N. und D.Challoner (1974). Distribution of interstitial cells and differentiating nematocytes in nests in Hydra attenuata. Amer.Zool.14, 537-542.

David, C.N. und Gierer, A. (1974). Cell cycle kinetics and development of H.attenuata. III. Nerve and nematocyte differentiation. J.Cell Sci. 16, 359-375.

David, C.N. und Murphy, S. (1977). Characterization of interstitial stem cells in hydra by cloning. Dev.Biol. 58, 373-383.

David, C.N. und MacWilliams, H.(1978). Regulation of the self-renewal probability in Hydra stem cell clones. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 75, 886-890.

David, C.N. (1982). Stem cell proliferation and differentiation

in hydra. In "Identification and characterization of stem cell populations", Hrsg. C.S.Potten. Churchill Livingstone, Edinburgh, S.13-27.

Diehl, F.A. und Burnett, A.L. (1964). The role of interstitial cells in the maintenance of hydra. I. Specific destruction of interstitial cells in normal, asexual, and non-budding animals. J.Exp.Zool. 155, 253-260.

Downing, E.R. (1905). Spermatogenesis of Hydra. Zool.Jb.Abt.Anat.u.Ontog. 21, 372-426.

Downing, E.R. (1909). The ovogenesis of Hydra. Zool.Jb.Abt.Anat.u.Ontog. 28, 295-322.

Francis, L. (1973). Intraspecific aggression and its effect on the distribution of Anthopleura elegantissima and some related sea anemones. Biol.Bull.144, 73-92 (1973).

Fujisawa, T. und C.N.David (1984). Loss of differentiating nematocytes induced by regeneration and wound healing in Hydra. J.Cell Sci.68, 243-255.

Gebicke-Härter, P.J., Althaus, H.-H., Neuhoff, V. (1984). Bulk separation and long term culture of oligodendrocytes from adult pig brain. I.Morphological studies. J.Neurochem. 42, 357-368.

Gierer, A., Berking S., David, C.N., Flick, K., Hansmann, G., Schaller, H., Trenkner, E.(1972). Regeneration of hydra from reaggregated cells. Nature (London) 239, 98-101.

Gierer, A. (1974). Hydra as a model for the development of biological form. Sci.Am.231, 44-54.

Goetsch, W. (1924). Chimärenbildung bei Coelenteraten. Zool.Anz.59, 19-30.

Hauenschild, C. (1954). Genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen über Intersexualität und Gewebeverträglichkeit bei Hydractinia echinata. Wilhelm Roux'Arch.Dev.Biol. 147, 1-41.

Hauenschild, C. (1956). Über die Vererbung einer Gewebeverträglichkeit bei dem Hydroid-polypen Hydractinia echinata. Z.Naturforsch. 11, 132-138.

Heimfeld, S. und Bode, H.R. (1984a). Interstitial cell migration in Hydra attenuata. I. Quantitative description of cell movements. Dev.Biol. 105, 1-9.

Heimfeld, S. und Bode, H.R. (1984b). Interstitial cell migration in Hydra attenuata. II. Selective migration of of nerve cell precursors as the basis for position-dependent nerve cell differentiation. Dev.Biol. 105, 10-17.

Hildemann, W.H. (1974). Some new concepts in immunological phylogeny. Nature 250, 116-120.

Hildemann, W.H., R.L.Raison, G.Cheung, C.J.Hull, L.Akaka und J.Okamoto (1977). Immunological specificity and memory in a scleractinian coral. Nature 270, 219-223.

Hildemann, W.H. (1979). Immunocompetence and allogeneic polymorphism among invertebrates. Transplantation 27, 1-3.

Holstein, T., Schaller, C.H. und David, C.N. (1986). Nerve cell differentiation in hydra requires two signals. Dev.Biol. 115, 9-17.

Issayev, V. (1924) Researches on animal chimaeras. J.Genetics 14, 273-349.

Kobatake, E. und Sugiyama, T. (1986). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XVII. Elimination of excess epithelial cells by phagocytosis in a mutant strain L4.

Dev.Biol. 115, 249-255.

Kolenkine, X. (1958). Les modalités de l'association tissulaires après hétéro-greffe entre Hydra attenuata et Pelmatohydra oligactis. C.R.Acad.Sci.Paris 246, 1605-1608.

Kolenkine, X. (1971). Les histocompatibilités intraspécifique et interspécifique chez les hydres d'eau douce. Arch.Zool.exp.gén.112, 63-70.

Lackie, A.M. (1980). Invertebrate Immunity. Parasitology 80, 393-412.

Le Douarin, N.M. (1980). The ontogeny of the neural crest in avian embryo chimaeras. Nature 286, 663-669.

Lee, H. und R.D.Campbell (1979). Development and behavior of an intergeneric chimera of hydra (Pelmatohydra oligactis interstitial cells and Hydra attenuata epithelial cells). Biol.Bull. 157, 288-296.

Lenhoff, H.M. und Brown, R.D. (1970). Mass culture of hydra: An improved method and its application to other aquatic invertbrates. Lab. Anim. 4, 139-154.

Lentz, T.L. (1966). "The cell biology of hydra." North Holland Publ.Co., Amsterdam, S.1-199.

Littlefield, C.L. (1984). The interstitial cells control the sexual phenotype of heterosexual chimaeras in hydra. Dev.Biol., 102, 426-432.

Littlefield, C.L. (1985). Germ cells in Hydra oligactis males: I. Isolation of a subpopulation of interstitial cells that is developmentally restricted to sperm production. Dev.Biol. 112, 185-193.

- Littlefield, C.L., Dunne J.F., Bode, H.R. (1985). Spermatogenesis in Hydra oligactis. I. Morphological description and characterization using a monoclonal antibody specific for cells of the spermatogenic pathway. Dev.Biol. 110, 308-320.
- Littlefield, C.L. (1986). Sex determination in hydra: Control by a subpopulation of interstitial cells in Hydra oligactis males. Dev.Biol., im Druck.
- Lubbock, R. (1980). Clone-specific cellular recognition in a sea anemone. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77, 6667-6669.
- Marcum, B.A. und Campbell, R.D. (1978). Development of hydra lacking nerve and interstitial cells. J.Cell Sci. 29, 17-33.
- Marcum, B.A., Fuijsawa, T. und Sugiyama, T. (1980). A mutant strain (sf-1) containing temperature-sensitive interstitial cells. In "Developmental and Cellular Biology of Coelenterates", Hrsg. P.und R.Tardent. Elsevier/North-Holland, Amsterdam. S.429-434.
- McCarrey, J.R. und Abbott, U.K. (1979). Mechanisms of genetic sex determination, gonadal sex differentiation, and germ cell development in animals. Adv.Genetics 20, 217-290.
- Metschnikoff, E. (1905). "Immunity in infective diseases". Cambridge Univ., London.
- Müller, W. (1964). Experimentelle Untersuchungen über Stockentwicklung, Polypendifferenzierung und Sexualchimären bei Hydractinia echinata. Roux'Arch.Dev.Biol. 155, 181-268.
- Munck, A. und David, C.N. (1985) Cell proliferation and differentiation kinetics during spermatogenesis in Hydra carnea. Roux's Arch.Dev.Biol. 194, 247-256.

- Nieuwkoop, P.D. und L.A.Sutasurya (1981). "Primordial germ cells in the invertebrates". Cambridge Univ.Press, Cambridge. S.1-183.
- Park, H.D., Sharpless, N.E. und Ortmeyer, A.B. (1965). Growth and differentiation in Hydra. J.Exp.Zool. 156, 289-306.
- Romeis, B. (1968). "Mikroskopische Technik". R.Oldenbourg, München, Wien. S.292ff.
- Rubin, D.I. und H.R.Bode (1982). The aberrant, a morphological mutant of Hydra attenuata, has altered inhibition properties. Dev.Biol. 89, 316-331.
- Sachs, L. (1974). "Angewandte Statistik". Springer, Berlin. S.147.
- Saier, M.H. und Jacobson, G.R. (1984). "The molecular basis of sex and differentiation". Springer, New York. S.174-186.
- Seidel, F. (1972). "Entwicklungsphysiologie der Tiere. I.Ei und Furchung". Walter de Gruyter, Berlin, New York. S.202.
- Sinclair, W.K. (1965). Hydroxyurea: Differential lethal effects on cultured mammalian cells during the cell cycle. Science 150, 1729-1731.
- Sproull, F. und David, C.N. (1979). Stem cell growth and differentiation in Hydra attenuata. II. Regulation of nerve and nematocyte differentiation in multiclone aggregates. J.Cell Sci. 38, 171-179.
- Sugiyama, T. und Fujisawa, T. (1977). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. I. Sexual reproduction of Hydra magnipapillata and isolation of mutants. Dev.Growth Diff. 19, 187-200.
- Sugiyama, T. und Sugimoto, N. (1985). Genetic analysis of

developmental mechanics in hydra. XI. Mechanisms of sex reversal by heterosexual parabiosis. Dev.Biol. 110, 413-421.

Takano, J., Fuijsawa, T. und Sugiyama, T. (1980). Growth rate and cell cycle of hydra. In "Developmental and Cellular Biology of Coelenterates", Hrsg. P. und R.Tardent. Elsevier/North-Holland, Amsterdam. S.409-414.

Tardent, P.(1966). Zur Sexualbiologie von Hydra attenuata. Rev.Suisse Zool. 73, 357-381.

Tardent, P. und Morgenthaler, U. (1966). Autoradiographische Untersuchungen zum Problem der Zellwanderungen bei H.attenuata Pal. Rev.Suisse Zool. 73, 468-480.

Tardent, P. (1985). The differentiation of germ cells in Cnidaria. In "The origin and evolution of sex". Allan R.Liss, New York. S.163 197.

Theodor, J.L. (1970). Distinction between "self" and "not-self" in lower invertebrates. Nature 227, 690-692.

Till, J.E. und McCulloch, E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat.Res. 14, 213-222.

Trenkner, E., Flick, K., Hausmann, G., Bode, H. und Bode, P. (1973). Studies on hydra cells in vitro. J.Exp. Zool. 185, 317-326.

Wanek, N. und R.D.Campbell (1982). Roles of ectodermal and entodermal epithelial cells in hydra morphogenesis: construction of chimeric strains. J.Exp.Zool.221, 37-47.

Weismann, A. (1880a). Zur Frage nach dem Ursprung der Geschlechtszellen bei den Hydroiden. I. Zool.Anz.3, 226-233.

Weismann, A. (1880b). Über den Ursprung der Geschlechtszellen bei den Hydroiden. II. Zool.Anz.3, 367-370.

Weismann, A. (1883). "Die Entstehung der Sexualzellen bei Hydramedusen". Gustav Fischer Verlag, Jena. S. 1-295.

Weismann, A. (1884). Die Entstehung der Sexualzellen bei Hydramedusen. Biol.Zentralbl.4, 12-32.

Weismann, A. (1892). "Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung". Gustav Fischer Verlag, Jena. S.1-628.

Wyllie, A.H., J.F.R.Kerr and A.R.Currie (1980). Cell death: the significance of apoptosis. Int.Rev.Cytol.68, 251-306.

Zihler, J. (1972). Zur Gametogenese und Befruchtungsbiologie von Hydra. Wilh.Roux's Archiv 169, 239-267.

D A N K S A G U N G

Bei dieser Arbeit haben viele mitgeholfen.

Ich danke Herrn Prof.David für die Betreuung. Seine Begeisterung und sein Optimismus trieben die Arbeit, über Höhen und Tiefen hinweg, von Teil 1 über Teil 2 schließlich zu Teil 3 voran.

Für die Überlaßung der Mutanten und das Interesse am Fortgang der Experimente danke ich Prof.Sugiyama, Mishima.

Prof.Tardent, Zürich, ließ mir unveröffentlichte Ergebnisse seiner Arbeitsgruppe zukommen, die wesentlich zur Entdeckung der Histokompatibilitätsreaktionen anregten.

Ich danke allen Mitarbeitern im Labor für ihr kritisches, immer geduldiges Zuhören. Dr.T.Holstein und Dr.K.Weijer sahen die veröffentlichten Teile dieser Arbeit kritisch durch. Ihnen und Dr.K.Moritz verdanke ich anregende Diskussionen.

Der Freistaat Bayern förderte die Arbeit mit einem Stipendium.

Die größte Unterstützung kam von zu Hause; dafür danke ich Frau Dr.J.Ittner.

## LEBENS LAUF

Bosch, Thomas Carl Georg

|            |                                                                                                              |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.9.1955   | geboren in Augsburg                                                                                          |
| 1961-1965  | Volksschule in Thannhausen                                                                                   |
| 1965-1975  | Humanistisches Gymnasium bei St.Stephan in Augsburg                                                          |
| 21.6.1975  | Abitur                                                                                                       |
| 1975-1976  | Wehrdienst                                                                                                   |
| 1977-1983  | Studium der Biologie an der Universität München                                                              |
| 1980/1981  | Stipendium der Universität München zum Studium der Biologie am University College of Swansea, Großbritannien |
| 27.10.1983 | Diplom in Biologie                                                                                           |
| 1983-1986  | Doktorarbeit am Zoologischen Institut der Universität München                                                |







